



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Paula Cristina de
Almeida Pinheiro**

**Modificação da superfície de nanofios magnéticos
para bio-aplicações**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

**Paula Cristina de
Almeida Pinheiro**

Modificação da superfície de nanofios magnéticos para bio-aplicações

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química do Ramo Inorgânica e Materiais, realizada sob a orientação científica do Doutor Tito Trindade, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Tito da Silva Trindade

Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor José Martinho Marques de Oliveira

Professor coordenador da Escola Superior de Design, Gestão e Tecnologia de Produção Aveiro Norte

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, tanto a nível pessoal como profissional.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador Doutor Tito Trindade pela orientação científica, apoio e disponibilidade durante todo este tempo.

Quero agradecer à Célia Sousa, aluna de doutoramento da Universidade do Porto que tanto me ajudou na fase da síntese dos nanofios, pela sua disponibilidade e prontidão para esclarecer qualquer dúvida em qualquer altura.

De seguida, quero deixar um agradecimento ao Doutor Jorge Guiomar da Universidade de Coimbra por me ter ensinado e orientado na fase da biofuncionalização.

À Doutora Violeta Girão pelos resultados de microscopia eletrónica, e pela sua amizade.

A todos os meus colegas do grupo Nanolab, pelo bom ambiente laboratorial e espírito de entreaajuda.

Aos meus amigos pelo apoio durante todo este tempo.

Queria deixar um agradecimento muito especial ao Rui Pedro pela paciência e compreensão ao longo de todo este tempo.

Por fim, aos meus pais e à minha irmã porque foram sempre a minha base de apoio, e permitiram que a realização deste trabalho fosse possível.

palavras-chave

Óxido de alumina, nanofios de níquel, polieletrólitos, fluorescência, biofuncionalização

resumo

As nanoestruturas 1D têm despertado um crescente interesse tendo em conta a possibilidade de construção de novos dispositivos funcionais. Nesta dissertação foram desenvolvidas estratégias de funcionalização superficial de nanofios de níquel que, devido às suas propriedades magnéticas, apresentam-se promissores em bio-aplicações. Neste sentido, foram sintetizados nanofios de níquel por eletrodeposição em molde de alumina. Este molde foi sintetizado a partir de uma folha de alumínio por um processo que envolve dois passos de anodização, e que leva à formação de uma camada de alumina nanoporosa onde é depositado o metal. Após a sua síntese, os nanofios foram funcionalizados com um polieletrólito (polietilenoimina- PEI) modificado quimicamente com um fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína - FITC), no sentido de desenvolver um material magnético e fluorescente, que permita a sua utilização em bio-aplicações. Neste âmbito, os nanofios de níquel modificados foram biofuncionalizados e a sua estabilidade em meio fisiológico foi avaliada. Finalmente, demonstrou-se a possibilidade de ligação dos nanofios a anticorpos para métodos de separação celular, utilizando plaquetas sanguíneas de bovino como sistema modelo.

keywords

Anodic aluminum oxide template, nickel nanowires, polyelectrolites, fluorescence, biofunctionalization

abstract

Quasi one-dimensional (1D) nanostructures have attracted great attention because they can be used to fabricate new functional devices. In this thesis chemical strategies for the synthesis and surface functionalization of nickel nanowires have been investigated. Hence, nickel nanowires were first synthesized by electrodeposition in alumina template. This template was prepared from an aluminum foil by a process that involves a two-step anodization process and that leads to the formation of a nanoporous alumina layer where the metal was deposited. The Ni nanowires were then surface modified with the polyelectrolyte (polyethyleimine- PEI) which has been previously functionalized with a fluorophore (fluorescein isothiocyanate- FITC). Considering the ferromagnetic properties of Ni nanowires, the functionalized materials have potential for bio-applications such as simultaneous magnetic separation and biolabelling of cells. Therefore, preliminary experiments were carried out to demonstrate the proof of concept by biofunctionalization of modified Ni nanowires and their conjugation to bovine blood platelets as a model system.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IX
I. INTRODUÇÃO	1
1. Nanofios de níquel: síntese e propriedades	6
1.1. Síntese dos nanofios de níquel por eletrodeposição em molde de alumina.....	7
1.1.1. Síntese do molde de alumina nanoporosa	8
1.1.2. Eletrodeposição pulsada	12
1.2. Propriedades magnéticas	13
1.3. Interação de nanofios de Ni com sistemas biológicos.....	15
2. Modificação superficial de nanopartículas usando polieletrólitos	19
2.1. Funcionalização química de polieletrólitos com fluoróforos: o FITC	23
3. Contextualização do trabalho e objetivos	25
II. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOFIOS DE NÍQUEL	27
1. Síntese dos nanofios de níquel por eletrodeposição	29
2. Morfologia e estrutura cristalina dos nanofios de níquel.....	29
III. MODIFICAÇÃO QUÍMICA SUPERFICIAL DE NANOFIOS DE NÍQUEL.....	33
1. Funcionalização do polieletrólito com o fluoróforo FITC	35

2.	Modificação de nanofios de Ni com PEI-FITC	39
IV.	INTERAÇÃO DE NANOFIOS DE Ni FUNCIONALIZADOS COM SISTEMAS BIOLÓGICOS	43
V.	CONCLUSÕES	53
VI.	EXPERIMENTAL	57
1.	Reagentes	59
2.	Procedimento Experimental.....	59
2.1.	Síntese dos nanofios de Ni por eletrodeposição	59
2.1.1.	Formação da camada de alumina porosa anódica	59
2.1.2.	Eletrodeposição	60
2.2.	Modificação superficial dos nanofios	61
2.2.1.	Funcionalização do polieletrólito com o fluoróforo FITC.....	61
2.2.2.	Modificação dos nanofios com PEI-FITC	61
2.3.	Interação dos nanofios de Ni funcionalizados com as plaquetas	61
2.3.1.	Teste controlo	61
2.3.2.	Biofuncionalização dos nanofios de Ni modificados com o anticorpo	62
2.4.	Estudo do efeito das lavagens na estabilidade dos nanofios de Ni modificados...	62
3.	Instrumentação e métodos de análise	62
3.1.	Potencial Zeta	62
3.2.	SEM	63
3.3.	TEM.....	63

3.4.	FTIR-ATR	63
3.5.	Espetroscopia de Fluorescência	63
3.6.	Difratometria de Raios-X	63
3.7.	Microscópio ótico de fluorescência.....	63
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1- Fotografia do cálice de Lycurgus cujo tom vermelho se deve à presença de nanopartículas de ouro dispersas no vidro, quando iluminada por um foco de luz no seu interior. ¹	4
Figura I.2– Aumento da razão entre a área superficial e volume, com a diminuição do tamanho de partículas. ⁴	5
Figura I.3- Ilustração dos quatro estágios principais da formação dos poros na membrana de alumina: formação da barreira de óxido (1); crescimento da camada de alumina (2); início da formação dos poros (3); crescimento dos poros (4). Adaptado da literatura. ¹⁷	10
Figura I.4- Processo de anodização que envolve duas etapas. Adaptado da literatura. ¹⁶⁻¹⁷	10
Figura I.5- Camada anódica formada sobre o alumínio metálico. Adaptado da literatura. ¹⁶⁻¹⁷	11
Figura I.6- Formação de dendrites por redução exponencial do potencial aplicado de 40 V para 8 V. Adaptado da literatura. ²⁰	12
Figura I.7- Ciclos de histerese dos nanofios de Ni com 40 nm de diâmetro. Adaptado da literatura. ²³	13
Figura I.8- Representação dos domínios magnéticos de um material ferromagnético. As setas representam os dipolos magnéticos. Adaptado da literatura. ²⁴	15
Figura I.9- Nanofios de níquel magneticamente alinhados. No entanto, alguns nanofios não ficaram alinhados enquanto outros agregaram (setas). Adaptado da literatura. ²⁵	15
Figura I.10- Ilustração do processo de separação da proteína com His da mistura. Adaptado da literatura. ²⁷	16

Figura I.11- Imagem de SEM dos fibroblastos em contacto com os nanofios de Ni e dos fibroblastos que livres. Adaptado da literatura. ²⁵	17
Figura I.12- Ilustração da funcionalização dos nanofios de Ni com o anticorpo anti-CD31. Adaptado da literatura. ³⁰	18
Figura I.13- Nanofio multifuncional. Adaptado da literatura. ³³	20
Figura I.14- Representação dos nanofios agregados por floculação (a) e nanofios individuais funcionalizados com polímeros (b).	21
Figura I.15- Funcionalização de nanofios de níquel pelo método LBL. Adaptado da literatura. ³⁸	22
Figura I.16- Estruturas químicas do PEI linear (a) e do PEI ramificado (b). Adaptado da literatura. ⁴¹	22
Figura I.17- Formas protolíticas do FITC. Adaptado da literatura. ⁴⁴	23
Figura I.18- Espectro de absorção (a) e de emissão de fluorescência (b) da fluoresceína em função do pH. Adaptado da literatura. ⁴⁶	24
Figura II.1- Imagens de SEM de nanofios de níquel sintetizados por eletrodeposição.	30
Figura II.2- Imagens de TEM dos nanofios de níquel sintetizados por eletrodeposição.	30
Figura II.3- Difractograma de Raios X de pós dos nanofios de níquel sintetizados por eletrodeposição.	31
Figura III.1- Reação entre grupo amina do polieletrólito e o grupo isotiocianato do FITC, com formação do grupo tiourea.	35
Figura III.2- Monitorização da intensidade da banda de emissão a 519 nm do dialisato, ao longo da diálise em PBS pH 7.4. Fotografia da montagem experimental (à direita).	36
Figura III.3- Espectros de fluorescência do FITC e do PEI-FITC. Espectros obtidos em soluções com pH 7.49 e 7.52, respetivamente.	36

Figura III.4- Espectro de FTIR do PEI e do PEI-FITC, obtidos na gama de números de onda entre 2000-500 cm^{-1} .	37
Figura III.5- Espectro de FTIR do FITC e do PEI-FITC, obtidos na gama de números de onda entre 2200-1800 cm^{-1} .	38
Figura III.6- Representação das interações eletrostáticas e não-eletrostáticas que se estabelecem entre os nanofios de Ni e o PEI-FITC. Adaptado da literatura. ⁵⁵	39
Figura III.7- Imagens de SEM de nanofios de Ni modificados com PEI-FITC.	40
Figura III.8- Espectro de EDX dos nanofios de Ni funcionalizados com PEI-FITC (a) e mapeamento do S nos nanofios por SEM-EDX (b).	40
Figura III.9- Espectros de fluorescência dos nanofios tratados com FITC (amostra NF-FITC) e funcionalizados com PEI-FITC (amostra (NF-PEI-FITC)). Espectros obtidos em soluções com pH 6.52 e 6.40, respetivamente.	41
Figura III.10- Imagens de microscopia ótica de fluorescência dos nanofios modificados com PEI-FITC: a) modo de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 537 \text{ nm}$); b) modo de transmissão.	42
Figura IV.1- Fotomicrografia de células sanguíneas. Adaptado da literatura. ⁵⁶	45
Figura IV.2- Representação da reação do anticorpo com os grupos amina do PEI, promovida pela EDAC. Adaptado da literatura. ⁵⁰	46
Figura IV.3- Imagens de microscopia ótica de fluorescência das amostras obtidas por separação magnética: a) modo de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 537 \text{ nm}$); b) modo de transmissão.	47
Figura IV.4- Imagens de microscopia ótica de fluorescência das amostras obtidas por centrifugação: a) modo de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 537 \text{ nm}$); b) modo de transmissão.	47

Figura IV.5- Imagens de microscopia ótica de fluorescência usando nanofios FITC-PEI-AC: a) modo de fluorescência ($\lambda_{ex}= 537$ nm); b) modo de transmissão. Amostra obtida por separação magnética.	48
Figura IV.6- Caracterização da amostra de nanofios com PEI-FITC após lavagens com tampão Tris pH 7.4, por SEM, EDX e fluorescência.	49
Figura IV.7- Caracterização da amostra de nanofios com PEI-FITC após lavagens com tampão Fosfato pH 5.5, por SEM, EDX e fluorescência.	50
Figura IV.8- Caracterização da amostra de nanofios com PEI-FITC após lavagens usadas na ligação do anticorpo, por SEM, EDX e fluorescência.	50
Figura VI.1- Processo de separação magnética das suspensões de nanofios de Ni.	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAO- Do inglês Anodic Aluminum Oxide (Óxido de alumínio anódico)

His- Histidina

SAMs- Do inglês Self assembled monolayers (monocamadas auto-organizadas)

FITC- Do inglês Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)

PEI- Polietilenoimina

IFIMUP-IN Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto - Instituto de Nanociência e Nanotecnologia

SEM- Do inglês Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrónica por Varrimento)

TEM- Do inglês Transmission Electron Microscopy (Microscopia Eletrónica por Transmissão)

u.a.- Unidades Arbitrárias

FTIR-ATR Do inglês Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier- reflectância total atenuada)

EDX- Do inglês Energy-dispersive X-ray spectroscopy (Espetroscopia por energia dispersiva de raios X)

AC- Anticorpo

EDAC- Hidrocloreto de 1-etil-(3-3-dimetilaminopropil) carbodiimida

PBS- Do inglês Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

BSA- Do inglês Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

I. Introdução

Neste capítulo descrevem-se conceitos fundamentais necessários para a compreensão do trabalho de investigação descrito nesta dissertação, bem como um enquadramento do trabalho e os objetivos propostos para a investigação desenvolvida. Inicialmente, é feita uma breve contextualização dos termos Nanociência e Nanotecnologia. De seguida, são descritos alguns aspetos gerais sobre os nanofios de níquel e o método de síntese utilizado neste trabalho. Na terceira parte apresentam-se alguns conceitos sobre a funcionalização de nanoestruturas usando polieletrólitos e a suas potenciais bio-aplicações. Por fim, é feito um enquadramento do trabalho em função dos objetivos propostos.

A Nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar.¹⁻³ Cientistas de materiais, engenheiros mecânicos e eletrônicos e investigadores médicos trabalham em conjunto com biólogos, físicos e químicos, entre outros, no sentido de desenvolver tecnologias que se caracterizam pelo conhecimento e aplicação de fenómenos que ocorrem à nanoescala. Na investigação de fenómenos à nanoescala há necessidade de partilhar conhecimentos sobre ferramentas e técnicas específicas, assim como conhecimentos fundamentais ao nível de interações atómicas e moleculares.^{1, 3-4}

O estudo de nanomateriais, cujas propriedades dependem largamente de fenómenos de dimensão e de superfície, ganhou importância significativa no final do século XX, tendo sido determinante na consolidação de uma área do conhecimento, designada por "Nanociência e Nanotecnologia". Assim, a Nanociência e a Nanotecnologia conjugam-se no sentido de produzir, caracterizar, manipular e utilizar materiais com dimensões típicas entre as moléculas e os materiais micrométricos. Ao criar estruturas com tamanhos nanométricos (1-100 nm) é possível controlar propriedades dos materiais, como por exemplo a temperatura de fusão, as propriedades magnéticas e óticas, sem contudo alterar a composição química do material.¹⁻⁵

No entanto, mesmo antes de conhecer e perceber os fenómenos à nanoescala o Homem usou empiricamente nanomateriais em diversas aplicações. Por exemplo o cálice de Lycurgus é um objeto romano do século 4 D.C. que contém nanopartículas de ouro e prata dispersas em vidro. As nanopartículas metálicas conferem cor rubi quando se ilumina o cálice a partir do seu interior, e apresenta cor verde quando é iluminado por luz exterior (Figura I.1).



Figura I.1- Fotografia do cálice de Lycurgus cujo tom vermelho se deve à presença de nanopartículas de ouro dispersas no vidro, quando iluminada por um foco de luz no seu interior.¹

Atualmente definem-se nanomateriais como sendo aqueles que possuem pelo menos uma dimensão à escala nanométrica (tipicamente entre 1-100 nm), resultando em alterações de propriedades que são função do tamanho e superfície. Assim, os nanomateriais apresentam propriedades distintas dos materiais análogos convencionais. Podemos distinguir diferentes classes de nanomateriais com base na sua dimensionalidade estrutural.²

Nanomateriais bidimensionais (2D): apresentam uma dimensão à escala nanométrica. São exemplos os filmes finos, as bicamadas lipídicas, as heteroestruturas semicondutoras de Arseneto de índio (InAs) (poços quânticos) e o grafeno.

Nanomateriais unidimensionais (1D): apresentam duas dimensões à escala nanométrica. Incluem-se nesta classe os nanotubos de carbono e os nanofios de diversos metais, como por exemplo de níquel.

Nanomateriais zero-dimensionais (0D): materiais que apresentam todas as dimensões à escala nanométrica. Nesta categoria incluem-se as nanopartículas inorgânicas, como por exemplo os pontos quânticos de semicondutores (quantum dots).

As propriedades dos materiais macrocristalinos (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas), tal qual as reconhecemos, manifestam-se a partir de um determinado tamanho de partícula, designado por tamanho crítico. Quando as partículas de um material têm uma dimensão inferior ao tamanho crítico há propriedades que se diferenciam relativamente às que se observam nos materiais macrocristalinos. Para um mesmo material, frequentemente o tamanho crítico é diferente para cada uma das suas propriedades, e para uma mesma propriedade, o tamanho crítico é diferente para diferentes

materiais. Além disso, para partículas com dimensões inferiores ao tamanho crítico, as propriedades do material também dependem da forma das partículas.³

Em certos casos, as propriedades dos nanomateriais são moldadas por efeitos quânticos de dimensão. Sendo assim, existem efeitos de confinamento quântico que permitem ajustar as propriedades dos materiais alterando o tamanho médio das partículas. Por exemplo, é possível alterar as propriedades de fluorescência de nanopartículas de CdSe variando o tamanho, o que permite que sejam usadas por exemplo como biomarcadores fluorescentes.

As nanopartículas apresentam áreas de superfície por volume elevadas, comparativamente aos materiais convencionais. A Figura I.2 ilustra o aumento da área de superfície específica de nanopartículas relativamente à de materiais de maiores dimensões.⁴

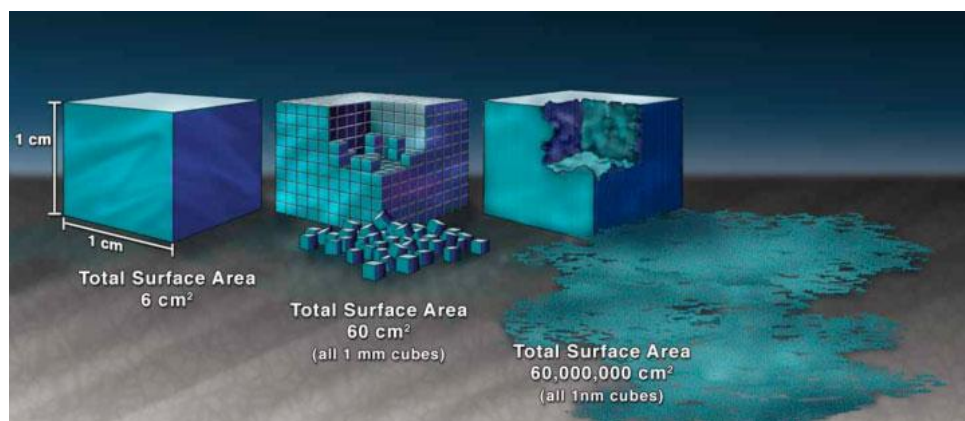


Figura I.2– Aumento da razão entre a área superficial e volume, com a diminuição do tamanho de partículas.⁴

Estas considerações indicam que podem ser preparados novos materiais, com novas propriedades e possibilidades de utilização, através do controlo do tamanho e da forma das partículas de materiais já conhecidos, sem que se altere a sua composição química e/ou estrutura cristalina típica.

O facto de muitos processos biológicos ocorrerem à nanoescala proporciona aos cientistas modelos para imaginarem e construírem novos processos que contribuam para áreas tão diversas como a medicina, imagiologia, mecânica, catálise, síntese de materiais, entre muitas outras. As propriedades apresentadas pelas nanoestruturas geram um grande número de aplicações como por exemplo nanodispositivos eletrónicos, materiais funcionais nanoestruturados, dispositivos com melhor desempenho como dispositivos fotovoltaicos.⁵⁻⁶

A investigação em métodos de síntese de nanomateriais é relevante pois permite o fabrico de nanomateriais para aplicações específicas em várias áreas.² De facto as propriedades dos nanomateriais dependem da sua composição química, tamanho e forma pelo que é importante que os nanomateriais sintetizados sejam bem definidos estrutural e dimensionalmente de modo a que as suas propriedades sejam ajustadas e permitam a sua funcionalização e aplicação.

Existem duas abordagens gerais em que se baseiam as técnicas de síntese dos nanomateriais: *top-down* e *bottom-up*.^{1-4, 10} A primeira abordagem baseia-se na miniaturização a partir de objetos de maiores dimensões, o que inclui processos de moagem e técnicas de litografia. Estas técnicas podem ser dispendiosas e muito demoradas, não sendo viáveis quando se pretende uma rápida e eficiente síntese de nanopartículas em grande escala. A abordagem *bottom-up* permite a síntese de materiais nanoestruturados a partir de átomos, iões, moléculas ou colóides, que apresentam a função de unidades de construção. Assim, esta abordagem permite um rigoroso controlo das propriedades dos materiais a sintetizar, tais como a sua estrutura cristalina, a forma e o tamanho. Vários processos de síntese foram desenvolvidos tendo como base esta abordagem, como a precipitação de sólidos em solução, a nucleação, e crescimento de nanoestruturas em sistemas que funcionam como nanoreatores, por exemplo as micelas, processos de sol-gel e deposição eletroquímica em moldes. Outras técnicas envolvem a deposição de polieletrólitos camada-a-camada e crescimento de copolímeros em bloco. A deposição eletroquímica e a auto-organização de nanopartículas baseada em processos de reconhecimento molecular têm-se mostrado promissores na obtenção de nanoestruturas funcionais.

1. Nanofios de níquel: síntese e propriedades

Os nanomateriais 1D apresentam duas dimensões nanométricas e são sistemas ideais para o estudo dos efeitos de redução de dimensionalidade e confinamento quântico em propriedades de transporte eletrónico e térmico. Por exemplo, pensa-se que poderão ser usados como blocos construtores da nova geração de dispositivos eletrónicos e óticos.^{1, 5, 11}

Foi em 1991, com a descoberta dos nanotubos de carbono por Iijima, que se verificou um interesse crescente nos materiais nanoestruturados 1D, como nanotubos, nanofios, nanobastonetes e nanofitas.³ A organização de nanofios perpendicularmente ao substrato permite a construção de dispositivos complexos e cujo princípio já foi usado para outros fins, como por exemplo construção de superfícies super-hidrofóbicas e construção de camadas antirrefletoras.⁷

Os nanofios são estruturas 1D uma vez que apenas uma das suas dimensões é superior a 100 nm, apresentando, por isso, razões de aspeto elevadas.⁸ Os nanofios podem ser metálicos, semicondutores ou isolantes.⁹ Estas nanoestruturas crescem segundo direções cristalográficas bem definidas. Apesar de existirem diversos métodos de síntese de nanoestruturas 1D, o método eletroquímico é um método eficiente no controlo da composição e morfologia desses nanomateriais.⁷

As nanopartículas magnéticas têm apresentado elevada aplicabilidade na área da biologia nomeadamente no estudo das funções celulares, na separação celular, na bio-deteção bem como na área da medicina.^{8, 10} Os nanofios magnéticos devido às suas propriedades anisotrópicas e à sua elevada área de superfície apresentam-se como uma promissora alternativa às nanopartículas convencionais em várias áreas nomeadamente nas bio-aplicações. Nesta secção é abordado o fabrico de nanofios magnéticos por eletrodeposição em moldes (“templates”).¹¹

1.1. Síntese dos nanofios de níquel por eletrodeposição em molde de alumina

Um dos métodos de síntese mais usados no controlo da forma e do tamanho de nanopartículas é a deposição em molde. O molde é uma membrana com poros de tamanho controlado, na ordem dos nanómetros ou dos micrómetros. Quando um material é depositado num molde adquire a sua forma mantendo a morfologia mesmo após a dissolução da membrana. Este método baseia-se na auto-organização das suas unidades de construção com um elevado grau de controlo permitindo obter as dimensões desejadas. Dependendo da sua arquitetura, estes moldes podem ser classificados em tridimensionais, o que inclui as micelas, os zeólitos ou blocos de copolímeros; em bidimensionais, referente a materiais em camada como por exemplo camadas múltiplas de polímeros e os filmes de

Langmuir-Blodgett; e existem ainda os moldes unidimensionais, que são os de interesse direto nesta dissertação.

Os moldes unidimensionais permitem sintetizar nanoestruturas com elevada razão de aspeto: nanofios e nanotubos. Estes moldes são normalmente membranas que apresentam poros verticais, na direção da espessura da membrana. Os moldes podem ser sintetizados quimicamente, como é o caso das membranas poliméricas ou das membranas anódicas de óxidos de metais (Al, Ti, Fe por exemplo). O molde condiciona a forma das nanoestruturas em crescimento, permitindo a síntese de nanofios a partir de vários materiais como polímeros e metais semicondutores.

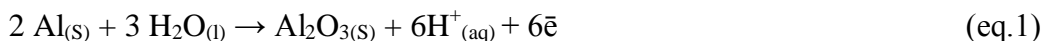
Dependendo da natureza do material, e de outros fatores como a química da parede do poro, podem ser sintetizados cilindros ocos ou não ocos, que se designam por nanotubos e por nanofios, respetivamente.¹¹⁻¹² Na escolha do molde a usar na síntese de nanofios, fatores como o tamanho do poro, a densidade e a forma do poro devem ser tidos em consideração e, se necessário, devem ser otimizados.

1.1.1. Síntese do molde de alumina nanoporosa

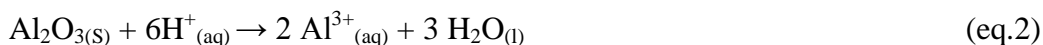
Embora exista uma vasta gama de materiais nanoporosos, os nanofios de níquel são preparados frequentemente por eletrodeposição em membrana de alumina anódica. A formação de uma camada porosa por anodização de alumínio é um dos métodos mais utilizados devido às propriedades específicas apresentadas pela camada anódica tais como resistência química e térmica, e permitem o controlo do crescimento e a forma dos poros.¹³ A formação destas membranas foi descrita pela primeira vez por Sullivan e Wood.¹⁴ Existem atualmente diversos métodos para a obtenção de membranas de alumina (Al_2O_3), no entanto, a anodização do alumínio é o processo mais comum tendo em conta a elevada afinidade do alumínio para o oxigénio. O alumínio metálico é oxidado facilmente pois tem um potencial normal de redução de -1,68 V. Assim, quando o alumínio está em contacto com água reage com oxigénio dissolvido na água originando uma camada de óxido à superfície.¹⁵ Esta reação é muito lenta mas pode ser acelerada por um processo eletroquímico, por aplicação de uma diferença de potencial, ocorrendo a oxidação do alumínio no ânodo da célula eletrolítica, por electromigração dos iões óxido, formando-se

Al_2O_3 . Para um melhor entendimento deste processo é importante perceber o que ocorre nas interfaces metal/óxido e óxido/eletrólito.¹⁶

A reação de anodização eletroquímica do alumínio é descrita pela seguinte semirreação de oxidação:



Simultaneamente ocorre dissolução de alumina na interface óxido/eletrólito devido ao pH ácido que se gera ($\text{pH} < 1.77$) devido ao aumento da concentração de H^+ (eq. 1), libertando íons Al^{3+} para o eletrólito:



Por outro lado, os íons H^+ migram para o cátodo onde são reduzidos:



O ajuste das condições de anodização permite que a dissolução da alumina na interface óxido/eletrólito ocorra à mesma velocidade da formação de óxido na interface metal/óxido, mantendo a espessura da camada barreira. O uso de uma solução de eletrólito durante o processo eletroquímico implica a existência de outras espécies em solução, como o SO_4^{2-} no caso de se usar como eletrólito o ácido sulfúrico.

Têm sido propostos vários modelos para explicar a formação dos poros na camada de alumina. Genericamente sugerem que as dimensões dos poros, a sua morfologia e a porosidade do molde dependem do potencial aplicado, do tempo de anodização e do pH. A formação dos poros pode ser explicada pela concentração das linhas de campo elétrico nas pequenas depressões que a membrana de alumina apresenta à superfície levando à dissolução da alumina nesses locais, de acordo com a reação apresentada anteriormente. Ocorre também uma competição entre os poros que determina os que se irão desenvolver.

O desenvolvimento da camada de alumina pode ser explicado por um processo que envolve quatro etapas. A Figura I.3 ilustra as etapas de formação e crescimento dos poros na camada de alumina. As etapas 1 e 2 representam a formação e crescimento da camada de alumina sob o alumínio metálico, respetivamente. A etapa 3 ilustra a nucleação e início

de formação dos poros, devido à distribuição do campo elétrico local nas flutuações da barreira de óxido. A última etapa representa o crescimento dos poros mantendo a espessura da barreira de óxido no fundo dos poros constante.¹⁷

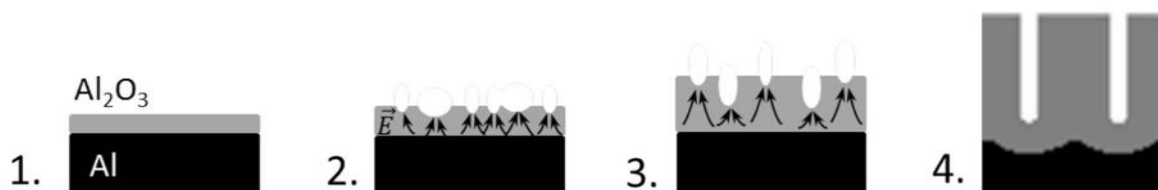


Figura I.3- Ilustração dos quatro estágios principais da formação dos poros na membrana de alumina: formação da barreira de óxido (1); crescimento da camada de alumina (2); início da formação dos poros (3); crescimento dos poros (4). Adaptado da literatura.¹⁷

Para que os poros cresçam de forma organizada, Masuda e colaboradores desenvolveram um método de anodização que envolve dois passos.¹³ O primeiro passo envolve um processo de anodização longo, formando uma camada nanoporosa cujos se poros apresentam inicialmente desorganizados mas que formam um arranjo hexagonal ao final de várias horas de anodização. Esta camada é parcialmente removida por ataque químico deixando moldes na superfície da alumina, o que permite o seu crescimento com melhor alinhamento e organização durante o segundo processo de anodização.¹³ Os parâmetros de anodização usados no segundo passo são os mesmos da primeira anodização, variando apenas o tempo de anodização dependendo do comprimento dos poros que se pretende obter, tendo em conta uma taxa de anodização de $2.5 \mu\text{m}/\text{hora}$. Para obter poros com 35 nm de diâmetro, o potencial aplicado durante as duas etapas de anodização é de 40 V , uma vez que estudos preliminares demonstram que a este potencial se forma uma estrutura nanoporosa mais organizada. O processo está esquematizado na Figura I.4.

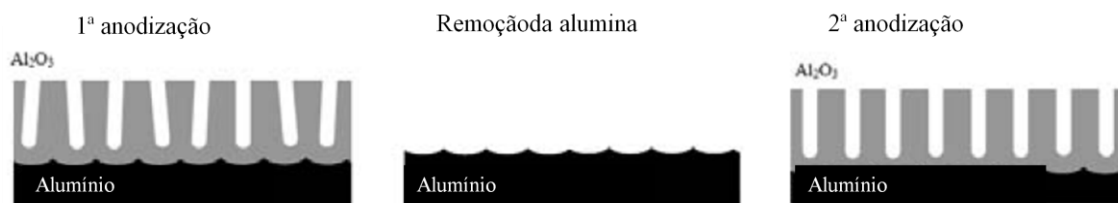


Figura I.4- Processo de anodização que envolve duas etapas. Adaptado da literatura.¹⁶⁻¹⁷

Este método de produzir uma membrana com distribuição de poros finos e pequenos por oxidação do alumínio está, atualmente, bem documentado. São preparadas por este processo membranas assimétricas do óxido de alumínio, constituídas por duas regiões: uma

camada de poros com diâmetros de 35 nm, e uma camada delgada com poros finos junto do metal (dendrites). Esta camada, composta de óxido de alumínio, é produzida na superfície do metal de forma controlada de modo que os poros que se formam são monodispersos com densidades entre 10^9 e 10^{12} poros/cm². O diâmetro do poro é dependente do potencial aplicado e do eletrólito usado, sendo 25, 35 e 150 nm quando são respectivamente utilizados os ácidos sulfúrico (25 V), oxálico (40 V) e fosfórico (195 V). Por sua vez, a temperatura e tempo de anodização influenciam a espessura do filme de óxido poroso.¹⁶⁻¹⁷

As membranas de alumina anódica apresentam uma alta ordenação da estrutura porosa, consistindo numa disposição de células hexagonais cada uma com um poro central perpendicular à superfície, e no fundo dos poros forma-se uma barreira de óxido, que separa a alumina nanoporosa do alumínio (Figura I.5).¹⁶

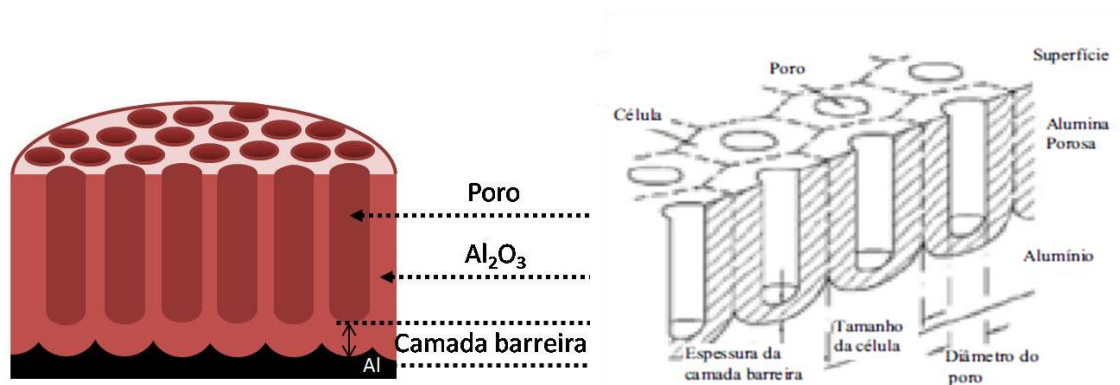


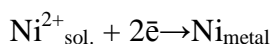
Figura I.5- Camada anódica formada sobre o alumínio metálico. Adaptado da literatura.¹⁶⁻¹⁷

A espessura da camada de óxido é proporcional ao potencial aplicado, com base na razão 1.3 nm/V. Por exemplo, se o potencial aplicado na segunda anodização for 40 V esta camada barreira terá uma espessura de 52 nm.

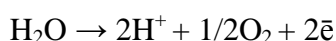
Os parâmetros mais importantes que influenciam a oxidação do alumínio e as propriedades do filme de óxido que se forma são a voltagem aplicada, o pH, e o tipo e concentração de eletrólito e a temperatura. O alumínio é anodizado a potencial constante ao longo do tempo. Uma dependência direta entre a voltagem aplicada e as dimensões dos poros foi determinada: o diâmetro do poro apresenta uma razão de 0.85 nm/V, a distância interporo 1.29 nm/V e a espessura da camada de alumina de 2.5 nm/V, apesar destes valores dependerem também do pH, temperatura e eletrólito.

1.1.2. Eletrodeposição pulsada

A deposição química de um metal a partir de uma solução aquosa com um sal do metal como precursor baseia-se numa reação eletroquímica. Os íons do metal do sal são reduzidos no cátodo. Assim, a eletrodeposição do níquel envolve as seguintes reações:



Por outro lado, no ânodo, eletrodo de platina, ocorre a seguinte reação em meio aquoso:



Existem três métodos de eletrodeposição em molde: por corrente direta, por corrente alternada e por corrente pulsada. O método de corrente pulsada consiste na aplicação de pulsos com duração de apenas alguns milissegundos. Como neste método não é necessária a remoção total da barreira de alumina, é possível sintetizar nanofios.¹⁸⁻¹⁹

No entanto, antes da eletrodeposição dentro dos poros da alumina, a barreira deste óxido presente no fundo dos poros tem de ser reduzida de modo a formar um caminho condutor através dos poros, entre o eletrólito e o eletrodo de deposição (alumínio). Assim, para reduzir a barreira de óxido de alumínio diminui-se o potencial exponencialmente após a segunda anodização, desde 40 V até 8 V, levando à formação de terminações ramificadas dos poros, designadas por dendrites (Figura I.6). A redução do potencial de anodização leva à diminuição da taxa de formação do óxido de alumínio, como resultado da redução do número de íons Al^{3+} que são gerados. Assim a taxa de dissolução do óxido será superior à taxa de formação levando à diminuição da espessura da barreira de alumina.²⁰

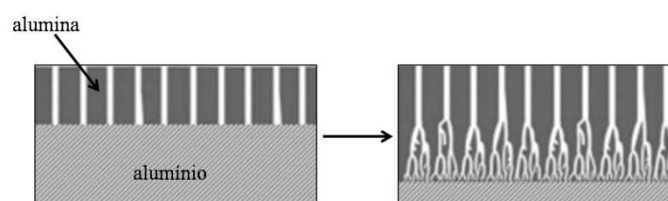


Figura I.6- Formação de dendrites por redução exponencial do potencial aplicado de 40 V para 8 V. Adaptado da literatura.²⁰

O método de eletrodeposição por corrente pulsada permite depositar uniformemente Ni nos poros do molde de alumina.

1.2. Propriedades magnéticas

Atualmente existe um grande interesse no estudo de nanofios magnéticos devido ao seu potencial tecnológico. Exemplos de aplicações incluem dispositivos para armazenamento de dados, análise de imagem por ressonância magnética, transporte de fármacos, imobilização de enzimas e separação celular.²⁵⁻²⁶

As propriedades magnéticas dos nanofios podem ser modeladas pelo controlo das suas dimensões, da forma e da sua composição.²¹ O método de síntese de nanofios de níquel por eletrodeposição em molde permite controlar a sua morfologia, originando estruturas ferromagnéticas.²⁵⁻²⁸ O níquel é um material ferromagnético abaixo da temperatura 365°C. Nos materiais ferromagnéticos os momentos magnéticos alinham-se paralelamente, resultando numa magnetização não nula mesmo na ausência de um campo aplicado.²² Este fenómeno designa-se por magnetização espontânea, verificando-se histerese magnética.

O comportamento de uma amostra ferromagnética pode ser caracterizado pela sua curva de histerese. Nesta classe de materiais, a curva de desmagnetização não é igual à de magnetização.²² A curva de histerese dos nanofios de níquel apresentada na Figura I.7 mostra a magnetização em função do campo magnético aplicado, e resulta da aplicação do campo paralela e perpendicularmente aos nanofios.²³ O eixo horizontal indica a intensidade de campo magnético H e o eixo vertical é a magnetização M do material.

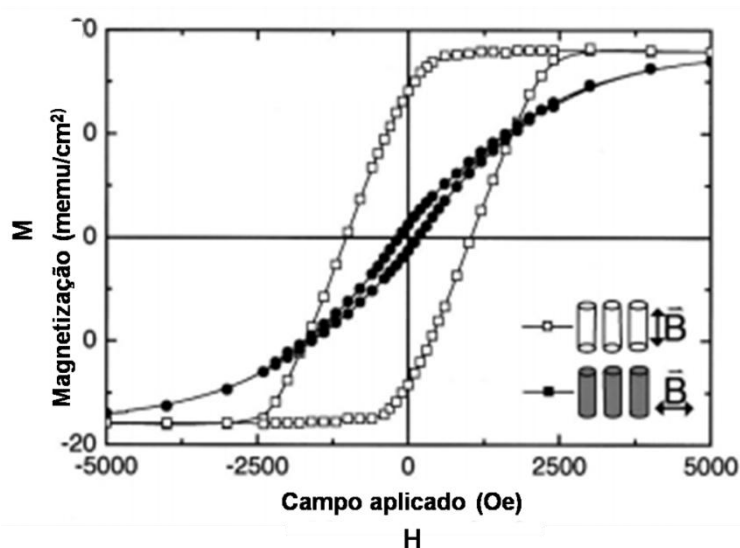


Figura I.7- Ciclos de histerese dos nanofios de Ni com 40 nm de diâmetro. Adaptado da literatura.²³

A curva de histerese mais larga resulta da magnetização dos nanofios de níquel com o campo externo aplicado paralelamente ao seu maior eixo, e a curva mais estreita resulta da magnetização por aplicação do campo elétrico perpendicularmente ao maior eixo dos nanofios. Esta diferença nas proporções das curvas de histerese resulta da elevada razão de aspeto dos nanofios de níquel, que origina anisotropia magnética.²³

Um material ferromagnético apresenta magnetização crescente em resposta à ação do campo magnético externo (H). No entanto, a partir de um certo valor de M , a magnetização tende a estabilizar, atingindo a saturação. É então aplicado um campo magnético decrescente até $H=0$ verificando-se uma magnetização remanescente. Por fim, é aplicado outro campo de um valor negativo de intensidade, que anula a magnetização residual. Se este campo for aumentado, atinge-se a saturação de sinal oposto. Tendo em conta estas considerações, a forma das curvas de histerese da Figura I.7, correspondentes aos nanofios de níquel, coincide com a forma das curvas características de um material ferromagnético.

Os materiais ferromagnéticos policristalinos são compostos por pequenas regiões, que se designam por domínios magnéticos, onde os dipolos estão alinhados entre si (Figura I.8). Devido ao alinhamento paralelo dos dipolos, cada domínio apresenta saturação magnética máxima. A soma das magnetizações dos vários domínios resulta no momento magnético total do material. Quando o campo externo é aplicado os domínios orientam-se em função do campo. Quando a orientação entre os domínios atinge um ponto máximo atinge a magnetização de saturação.²⁴

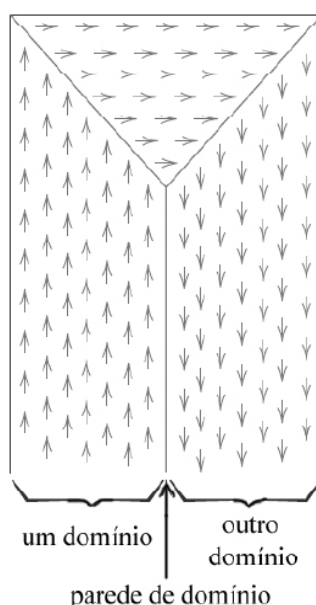


Figura I.8- Representação dos domínios magnéticos de um material ferromagnético. As setas representam os dipolos magnéticos. Adaptado da literatura.²⁴

Na Figura I.9 é possível constatar os nanofios de Ni alinhados devido a aplicação de um campo magnético externo.

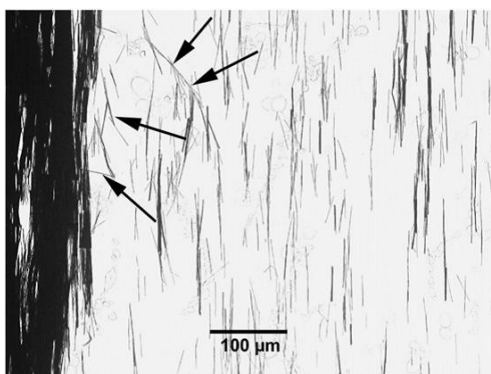


Figura I.9- Nanofios de níquel magneticamente alinhados. No entanto, alguns nanofios não ficaram alinhados enquanto outros agregaram (setas). Adaptado da literatura.²⁵

1.3. Interação de nanofios de Ni com sistemas biológicos

A interação entre os nanomateriais e os sistemas biológicos tem despertado, atualmente, um crescente interesse tendo em conta as suas potenciais aplicações biomédicas e industriais. A capacidade de utilizar nanofios e nanopartículas como suporte para ancoragem de anticorpos e marcadores fluorescentes deve-se aos avanços na química de

coordenação de superfícies, permitindo o uso destes sistemas no transporte de fármacos e biodeteção.²⁶ As propriedades magnéticas dos nanomateriais permitem a sua aplicação em várias áreas como a distribuição de fármacos, em ressonância magnética (como agentes de contraste), no tratamento por hipertermia, e separação de moléculas de interesse biológico a partir de misturas complexas, como proteínas.²⁶

Um processo importante para os investigadores que trabalham com proteínas é a sua separação e purificação. Um grupo de investigadores sintetizou nanofios multissegmentados de ouro (Au) e níquel (Ni) por eletrodeposição em molde, de forma a obterem diâmetros uniformes e segmentos com os comprimentos pretendidos. O segmento de Ni proporciona o local de interação das histidinas (His) da proteína e propriedades ferromagnéticas à nanoestrutura, e as extremidades de Au protegem quimicamente o níquel, proporcionando ainda uma segunda plataforma para a ancoragem de uma funcionalidade química, por interação com moléculas contendo grupos tióis, por exemplo. Na Figura I.10 está representado o processo de separação da proteína de interesse usando nanofios multissegmentados Au-Ni-Au.²⁷

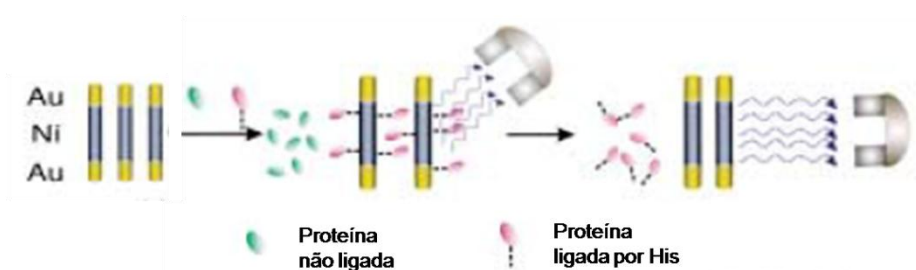


Figura I.10- Ilustração do processo de separação da proteína com His da mistura. Adaptado da literatura.²⁷

Os investigadores demonstraram que a utilização de nanofios contendo Ni permite a separação eficiente de misturas complexas de biomoléculas, com base nas propriedades físicas e químicas das nanoestruturas.²⁷ No entanto, atualmente a área que tem despertado mais interesse é o uso de nanofios magnéticos em separação e manipulação celular.²⁸ Neste sentido, recentemente os nanofios de Ni ferromagnéticos têm sido intensivamente usados na manipulação magnética de células, tirando partido da sua elevada razão de aspeto, propriedades anisotrópicas e elevada magnetização intrínseca, que permite a sua utilização mesmo em ambiente de baixo campo magnético externo.^{31, 34-36}

Alguns grupos de investigação têm-se dedicado à comparação da eficiência da separação celular com nanopartículas e com nanofios magnéticos, concluindo que os nanofios apresentam vantagem tendo em conta serem nanoestruturas alongadas com um forte momento magnético, e portanto exercem uma força maior sobre as células. Esta vantagem resulta da elevada razão de aspeto destas nanoestruturas, conferindo-lhes uma elevada anisotropia magnética.^{31, 34} Assim, usando nanofios magnéticos obtém-se um maior número de células separadas e com maior pureza.³⁴⁻³⁶

As propriedades peculiares dos nanofios ferromagnéticos permitem a sua potencial aplicação no controlo da organização espacial das células. Um estudo publicado demonstra que é possível obter células alinhadas através da interação com nanofios magnéticos. Neste trabalho, foi demonstrado que a presença dos nanofios de níquel no meio de cultura, fixados à superfície, induz o crescimento orientado das células, induzindo alterações ao nível do citoesqueleto e, portanto, na morfologia das células (Figura I.11).²⁵

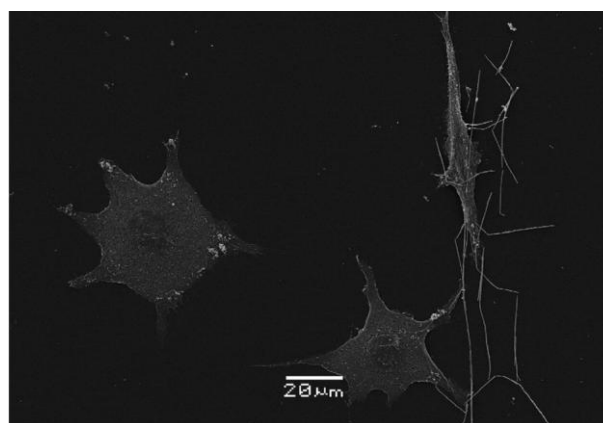


Figura I.11- Imagem de SEM dos fibroblastos em contacto com os nanofios de Ni e dos fibroblastos que livres. Adaptado da literatura.²⁵

Na imagem de SEM é visível a alteração da morfologia dos fibroblastos quando estão em contacto com os nanofios de Ni, apresentando uma forma mais alongada.

Neste estudo foi ainda possível verificar a separação de celular efetiva usando nanofios de Ni sem qualquer modificação superficial.²⁵ No entanto, para aumentar a eficiência separativa é necessário desenvolver técnicas de funcionalização de superfície destas nanoestruturas, de modo a promover e controlar interações específicas com as células ou outros sistemas biológicos.²⁵

Muitos trabalhos publicados no âmbito da separação celular usando estas nanoestruturas ferromagnéticas implicam a internalização dos nanofios nas células, o que é possível via integrinas ou por afinidade com as paredes celulares, via interações de superfícies hidrofílicas. No entanto, este método não permite a separação seletiva das células.²⁹⁻³⁰

Deste modo, para se obter uma separação celular específica e eficiente é necessária uma funcionalização superficial adequada dos nanofios. Neste sentido, alguns grupos de investigação têm-se dedicado a esta área, desenvolvendo métodos de modificação superficial dos nanofios de Ni, principalmente envolvendo a ancoragem de anticorpos.

Em 2010, Gao e o seu grupo de investigação desenvolveram um método de conjugação da superfície dos nanofios de Ni com o anticorpo anti-CD31, específico para células endoteliais de ratos, através de monocamadas auto-organizadas (SAMs) e ligações químicas covalentes. O esquema do processo de modificação está representado na Figura I.12.³⁰

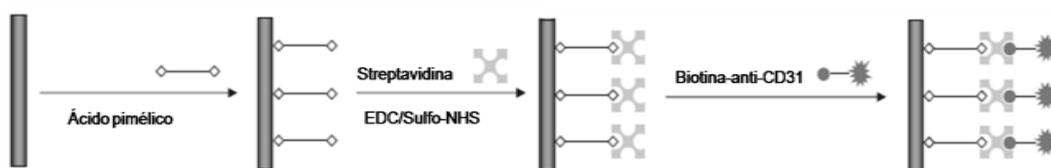


Figura I.12- Ilustração da funcionalização dos nanofios de Ni com o anticorpo anti-CD31. Adaptado da literatura.³⁰

Os nanofios foram primeiramente modificados com ácido pimélico, formando SAMs com terminais carboxílicos. Estes grupos reagiram com os terminais amínicos de streptavidinas, sendo por fim ligado o anticorpo específico conjugado com biotina, por acoplamento biotina-streptavidina. Esta estratégia de síntese de um sistema específico para aplicação em separação celular, mostrou-se eficaz, tendo os autores concluído que os nanofios de Ni têm maior capacidade separativa do que as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.³⁰

A questão da toxicidade dos nanofios de níquel é crítica principalmente quando o objetivo é a sua utilização ao nível da separação celular. Muitos estudos têm sido desenvolvidos neste sentido, tendo-se verificado que a citotoxicidade está essencialmente relacionada com a proporção das concentrações nanofios/células. Se esta razão for superior a 100, verifica-se que os nanofios são tóxicos para as células logo após 10 h de incubação.³⁰⁻³¹ Ou seja, em elevadas concentrações os nanofios de níquel podem ser tóxicos para as células, o

que pode inviabilizar os estudos desenvolvidos com base na interação dos nanofios e com as células.³⁰⁻³¹ No entanto, alguns estudos, desenvolvidos *in vitro*, publicados na área da separação celular utilizando nanofios de níquel demonstram que a cultura de células se mantém viável durante alguns dias.³¹ Num estudo de aplicação dos nanofios de níquel para separação celular, usando fibroblastos, a cultura celular manteve-se sem qualquer alteração e portanto sem sinais de toxicidade dos nanofios durante três dias.^{28, 32} Num outro estudo de aplicação dos nanofios de níquel por internalização em osteoblastos e células da medula verificaram alterações na resposta dos organelos, no entanto estas modificações não afetaram a viabilidade celular.²⁹ Assim, os resultados obtidos de vários estudos de citotoxicidade dos nanofios de Ni apontam no sentido da viabilidade da sua aplicação na manipulação magnética e biomarcação celular *in vitro* para aplicações de diagnóstico clínico, incluindo manipulação e separação celular.^{31, 34-35, 37}

A questão da toxicidade deve ser abordada principalmente quando se pretende que as células continuem viáveis na presença dos nanofios de níquel durante longos períodos de tempo.³¹ Uma solução é a funcionalização superficial destas nanoestruturas com materiais biocompatíveis, como polímeros orgânicos ou outro tipo de ligandos.

2. Modificação superficial de nanopartículas usando polieletrólitos

A funcionalização das nanopartículas com moléculas orgânicas é um aspeto importante para fins medicinais, pois deve-se assegurar a estabilidade da suspensão, a não toxicidade e não deve alterar as propriedades magnéticas das nanopartículas. Apesar de muitos trabalhos estudarem os efeitos da escala nanoscópica na magnetização, ainda há poucos estudos sobre como os grupos funcionais e o meio onde as nanopartículas se encontram alteram o seu comportamento magnético.

A modificação superficial de nanomateriais é fundamental pois determina o modo como interagem com o ambiente circundante. Por exemplo, a funcionalização da superfície das NPs confere-lhes maior estabilidade em solução de modo a evitar a sua agregação, e podem promover a biocompatibilidade, aspetos relevantes em bio-aplicações.

Meyer e colaboradores desenvolveram um método de funcionalização seletiva, que se baseia na química de superfície dos nanofios. Neste trabalho, nanofios magnéticos com dois segmentos, Au/Ni, foram derivatizados com ligandos específicos, tendo sido, posteriormente, acopladas biomoléculas aos seus grupos funcionais livres (R ou R').^{9, 33} À superfície de níquel foi coordenada uma molécula contendo grupos funcionais carboxílicos, e o segmento de ouro foi funcionalizado com um ligando contendo grupos tiol (Figura I.13).³³

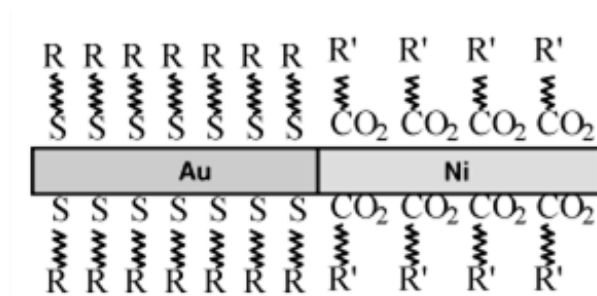


Figura I.13- Nanofio multifuncional. Adaptado da literatura.³³

Em 2006, foi documentado um trabalho em que foram sintetizados nanofios trissegmentados Ni-Au-Ni.^{9, 34} A funcionalização da superfície do níquel foi conseguida usando polipéptidos contendo poli-histidina. Num outro estudo de funcionalização de nanofios multissegmentados, a superfície de níquel foi funcionalizada com ácido palmítico de modo a formar uma superfície hidrofóbica, e a superfície de ouro foi funcionalizada com um oligômero hidrofílico.³⁵ A modificação da superfície possibilita a adsorção diferencial de biomoléculas na mesma estrutura híbrida.

A funcionalização de NPs por deposição camada a camada de polieletrólito (LbL) tem tido elevada relevância na obtenção de estruturas homogêneas e funcionalizadas à superfície.³⁶⁻³⁷ Esta técnica envolve a deposição de macromoléculas que possuem grupos iônicos, polieletrólitos, através da adsorção camada a camada em soluções aquosas. Os polieletrólitos são depositados na superfície das NPs devido a interações eletrostáticas, uma vez que são depositados alternadamente polieletrólitos de carga oposta. Existem no entanto outro tipo de interações, como seja interações de van der Waals e dipolo-dipolo, que podem ser relevantes. A deposição alternada de camadas de polieletrólitos leva à formação de estruturas estratificadas.

Este processo é simples e versátil, permitindo a formação de filmes com uma vasta gama de materiais, incluindo proteínas e polieletrólitos, que podem ser depositados em nanomateriais com diversas formas (nanofios, nanobastonetes, nanotubos, nanopartículas esféricas) e tamanhos.

Para se obter nanofios revestidos com polímeros bem definidos e estáveis em solução é necessário ter em conta alguns fatores que induzem a floculação destas nanopartículas.³⁷ Na Figura I.14 estão representados nanofios agregados por floculação (Figura I.14-a) e nanofios individuais revestidos com polímero (Figura I.14-b).

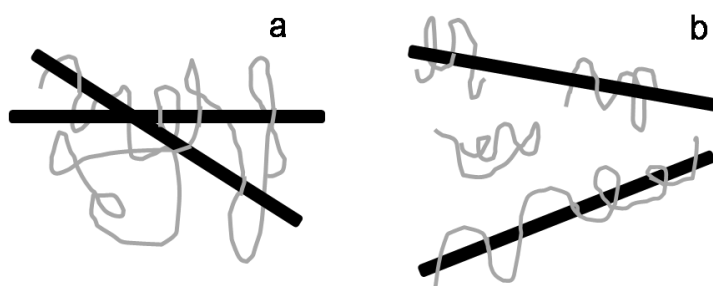


Figura I.14- Representação dos nanofios agregados por floculação (a) e nanofios individuais funcionalizados com polímeros (b).

Alguns estudos desenvolvidos neste campo sugerem que a funcionalização eficaz da superfície dos nanofios com polieletrólitos é conseguida na presença de um excesso de polieletrólito em relação à concentração de nanofios, que resulta na funcionalização uniforme da superfície das nanoestruturas e na estabilidade da suspensão. O tamanho do polieletrólito, que depende do seu grau de polimerização, é também um importante fator a ter em conta: se as cadeias de polímero forem demasiado longas favorecem a floculação dos nanofios, por outro lado se as cadeias forem demasiado pequenas a funcionalização da superfície das nanopartículas é incompleta.³⁷

Um grupo de investigadores utilizou esta técnica para funcionalizar a superfície de nanofios de níquel, com carboximetilpululano (carregado negativamente) e com quitosano (carregado positivamente) (Figura I.15).³⁸ Este processo pode facilmente ser reproduzido com nanofios de outros metais ou nanofios inorgânicos, sendo também viável a utilização de outros polissacarídeos, permitindo a síntese de inúmeras bio-nanoestruturas funcionais.³⁸

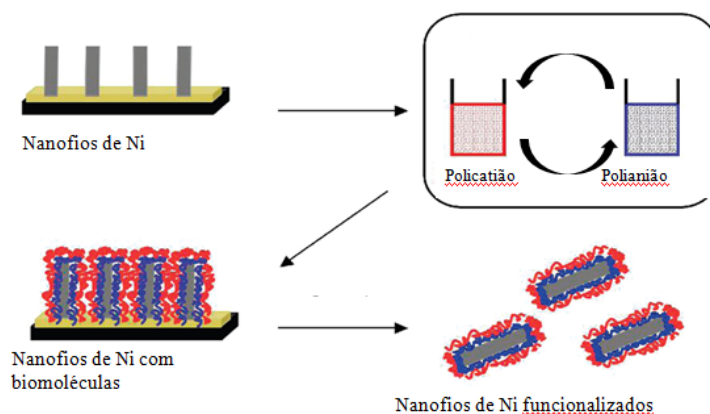


Figura I.15- Funcionalização de nanofios de níquel pelo método LBL. Adaptado da literatura.³⁸

A polietilenoimina (PEI) é um polímero solúvel em água, com elevada densidade de carga muito usado em bio-aplicações uma vez que apresenta elevada biocompatibilidade.³⁹ É usado em bioprocessos de transferência de ácidos nucleicos através das membranas biológicas, na purificação de proteínas, na transferência de genes e na imobilização de enzimas e bactérias.⁴⁰⁻⁴¹ O PEI foi o polieletrólito selecionado para investigação nesta fase.

O PEI pode ter uma estrutura ramificada ou linear, estando ainda disponível numa vasta gama de pesos moleculares. O PEI linear contém apenas aminas secundárias enquanto a unidade monomérica do PEI ramificado contém aminas secundárias, primárias e terciárias na proporção 1:2:1 (Figura I.16).⁴¹⁻⁴² A gama de pesos moleculares de PEI ramificado disponíveis comercialmente é 0.7-800 kDa, sendo o pKa das suas aminas primárias 5.5. Por outro lado, PEI linear está disponível com os pesos moleculares 22-220 kDa, e o pKa das aminas primárias é semelhante ao do PEI ramificado.⁴²

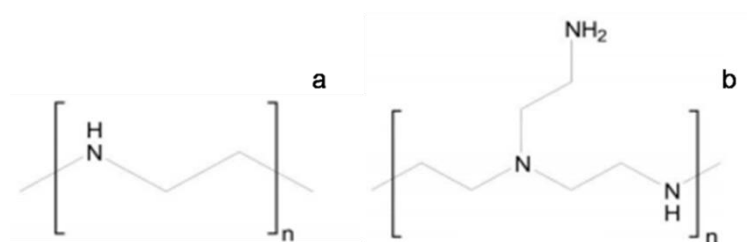


Figura I.16- Estruturas químicas do PEI linear (a) e do PEI ramificado (b). Adaptado da literatura.⁴¹

2.1. Funcionalização química de polieletrólitos com fluoróforos: o FITC

A conjugação de fluoróforos a polímeros permite a obtenção de sistemas fluorescentes para serem usados em biomarcação, sendo possível seguir processos ao nível celular por fluorescência.

A funcionalização dos grupos funcionais da superfície das nanoestruturas é muito importante ao nível da engenharia molecular das superfícies que proporciona o desenvolvimento de dispositivos sensoriais por acoplamento de polímeros orgânicos, biomoléculas e fluoróforos. O suporte polimérico é muitas vezes funcionalizado por reação química com um fluoróforo para a aplicação em técnicas bioanalíticas empregando a detecção por fluorescência. Apenas polímeros com grupos funcionais como $-OH$, $-NH$ e $-CHO$ podem ser utilizados.⁴³

A detecção por fluorescência é normalmente conseguida pela detecção de bandas características de fluoróforos. No entanto, a análise quantitativa ainda é limitada, tendo em conta alguns fatores como a adsorção não específica, a funcionalização do fluoróforo não homogênea, a incorporação de moléculas de corante na rede polimérica, sem ser por ligação covalente aos grupos funcionais, as interações entre as moléculas de corante que podem levar à extinção da emissão de fluorescência, e a sensibilidade das propriedades espectroscópicas do fluoróforo em relação ao seu ambiente.⁴³

O fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) é um derivado da fluoresceína muito usado em biomarcação de proteínas e células, e na funcionalização de anticorpos para biodetecção de moléculas específicas. Apresenta um elevado coeficiente de extinção e um elevado rendimento quântico de fluorescência. Em solução aquosa a fluoresceína apresenta quatro formas protolíticas: catiónica, neutra, aniónica e dianiónica (Figura I.17).⁴⁴⁻⁴⁵

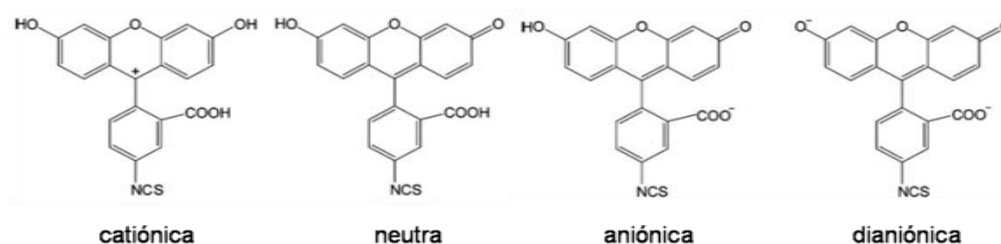


Figura I.17- Formas protolíticas do FITC. Adaptado da literatura.⁴⁴

A existência destas formas iônicas em solução faz com que os seus espectros eletrônicos em solução sejam dependentes do pH. Consequentemente, o comprimento de onda máximo de emissão e a forma do espectro variam com o pH, tal como se pode verificar na Figura I.18.⁵⁰⁻⁵²

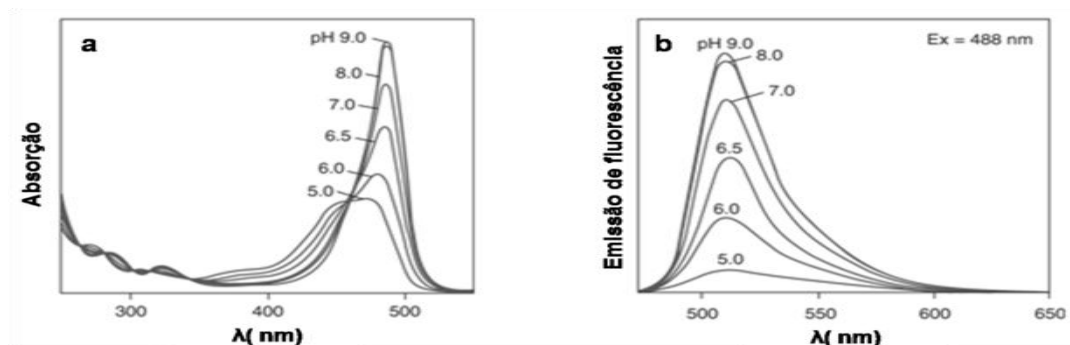


Figura I.18- Espectro de absorção (a) e de emissão de fluorescência (b) da fluoresceína em função do pH. Adaptado da literatura.⁴⁶

A maioria das biomoléculas não apresenta emissão intrínseca na região do visível, razão pela qual costumam ser marcadas com fluoróforos. Estes fluoróforos são conjugados covalentemente com biomoléculas ou outras moléculas com grupos reativos, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, polímeros orgânicos. O FITC tem um grupo isotiocianato que se liga covalentemente a aminas primárias e secundárias.⁵³⁻⁵⁴

O FITC pode então ser conjugado com polieletrólitos que contenham grupos amina reativos, como é o caso do PEI. Este conjugado (PEI-FITC) encontra-se descrito na literatura para aplicações como biomarcação e deteção de biomoléculas. Já foi usado para funcionalizar nanopartículas de poliestireno pelo método de camada a camada, alternando com plasmídeos de DNA (molécula com cargas negativas à superfície). A utilização do FITC foi importante para acompanhar o processo de deposição através da emissão por fluorescência.⁴⁷

3. Contextualização do trabalho e objetivos

Os nanofios de níquel são estruturas unidimensionais com propriedades ferromagnéticas, que têm despertado um crescente interesse na comunidade científica. A eletrodeposição em molde de alumina nanoporosa é, atualmente, o método de síntese mais usado uma vez que é simples e pouco dispendioso. O uso de um molde durante a síntese dos nanofios permite o controlo das suas dimensões. A elevada área de superfície dos nanofios de níquel permite a sua funcionalização com uma elevada variedade de moléculas, quer por ligação química covalente, ou por adsorção. O método de deposição de polímeros por camada a camada permite a funcionalização uniforme da superfície de nanoestruturas, proporcionando locais de ligação para outras moléculas através dos grupos funcionais do polieletrólito, nomeadamente fluoróforos e moléculas de interesse biológico. O PEI ramificado é um polieletrólito biocompatível, que apresenta grupos amina primários e secundários disponíveis para formarem ligações covalentes. O FITC é um fluoróforo que contém um grupo isotiocianato muito reativo, que forma ligações do tipo tioureia com as aminas primárias ou secundárias. Este fluoróforo é muito usado em biomarcação. Assim, a formação de um conjugado PEI-FITC permite a funcionalização da superfície dos nanofios de Ni, permitindo ainda a ligação de biomoléculas. Os anticorpos apresentam grupos carboxílicos disponíveis para se ligarem aos grupos amina do PEI. O anticorpo confere especificidade ao sistema, sendo a separação celular *in vitro* uma promissora aplicação deste sistema. Pelo que este trabalho teve como objetivo a síntese de nanofios de Ni e a sua modificação superficial com PEI-FITC. Como prova de conceito da aplicação destes sistemas em separação celular, realizaram-se estudos de interação dos nanofios de Ni funcionalizados com anticorpos de origem animal e células sanguíneas de bovino (plaquetas).

II. Síntese e caracterização dos nanofios de níquel

Esta secção é dedicada ao processo de síntese e à caracterização dos nanofios de níquel, estando, por isso, dividida em duas partes. Na primeira parte, é discutido o processo de síntese dos nanofios de níquel, ponto que merece uma especial atenção tendo em conta tratar-se de um processo novo no âmbito do nosso grupo de investigação. Na segunda parte são apresentados e interpretados os resultados de caracterização destas nanoestruturas. Os materiais foram caracterizados, morfológica e estruturalmente, de modo a avaliar as suas propriedades físicas e químicas tendo em vista potenciais bio-aplicações, nomeadamente em separação celular. As amostras de nanofios estudadas nesta dissertação foram produzidas pelo autor no Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto - Instituto de Nanociência e Nanotecnologia (IFIMUP-IN), através de uma colaboração entre o grupo do Prof. Doutor Tito Trindade e o grupo do Prof. Doutor João Pedro Araújo.

1. Síntese dos nanofios de níquel por eletrodeposição

Os nanofios de Ni foram sintetizados por eletrodeposição numa membrana de alumina nanoporosa, fabricada a partir de um processo eletroquímico de anodização do alumínio. O processo de anodização de alumínio envolveu dois passos, no sentido de promover a formação de uma estrutura de alumina nanoporosa organizada.¹³ A primeira anodização consiste num período de anodização longo, sendo de seguida a camada de alumina formada dissolvida quimicamente, resultando em depressões no alumínio que funcionam como locais de iniciação para o desenvolvimento e crescimento dos poros de um modo organizado no segundo passo de anodização.

O potencial aplicado durante o processo de anodização condiciona as dimensões dos poros da camada de alumina, pelo que foram desenvolvidos vários estudos preliminares por investigadores do IFIMUP-IN.¹⁷ Estes estudos foram bastante úteis para este trabalho uma vez que permitiram adotar as condições ideais de anodização utilizando como eletrólito o ácido oxálico a 40 V. As dimensões dos poros são, ainda, condicionadas pela composição do eletrólito, a temperatura e o tempo de anodização.

Os nanofios de níquel foram sintetizados por eletrodeposição pulsada. Este método combina um pulso de corrente constante para a deposição do níquel nos moldes, reduzindo os iões Ni(II) ao respetivo metal. O método de eletrodeposição em membrana de alumina é um processo alternativo simples e económico para sintetizar nanofios magnéticos. É um método muito eficiente e não condiciona o tamanho dos nanofios que queremos sintetizar. A principal vantagem deste método é que permite o controlo da razão de aspeto dos nanofios (comprimento/diâmetro), o que nem sempre é acessível com outras técnicas de síntese.

2. Morfologia e estrutura cristalina dos nanofios de níquel

Os nanofios sintetizados foram caracterizados estruturalmente por difração de raios X e a sua morfologia foi analisada usando técnicas de microscopia eletrónica, SEM e TEM.

A Figura II.1 mostra imagens de SEM dos nanofios de níquel.

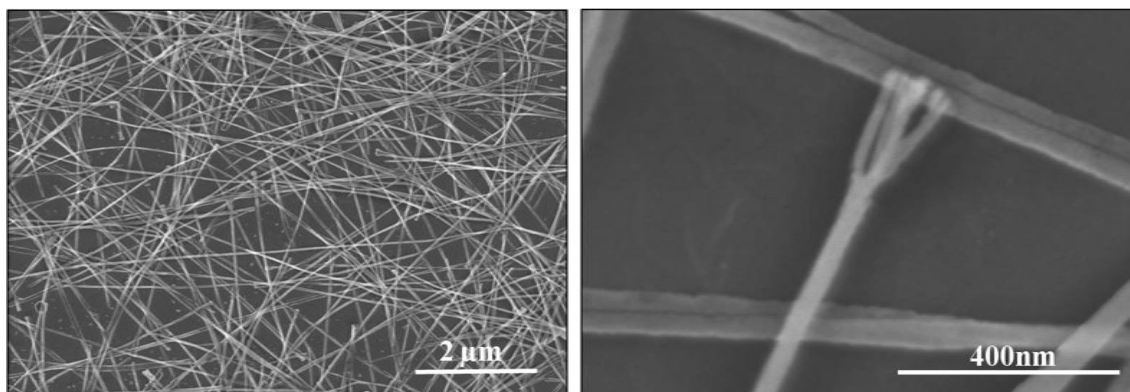


Figura II.1- Imagens de SEM de nanofios de níquel sintetizados por eletrodeposição.

O tamanho dos nanofios depende do tempo da segunda anodização no processo de formação da membrana nanoporosa de alumina. Neste caso a taxa de anodização foi de 2.5 μm/hora, obtendo-se nanofios com diâmetro e comprimento típicos de 35 nm e de 5 μm, respetivamente, sendo a razão de aspeto 140.

Na Figura II.1 é possível verificar a presença de dendrites na extremidade dos nanofios. Tal como referido anteriormente, estas dendrites formam-se pelo decréscimo exponencial do potencial aplicado após a segunda anodização. Estas dendrites podem ser preenchidas com cobre, que é um material condutor, de modo a facilitar a eletrodeposição do níquel nos poros.

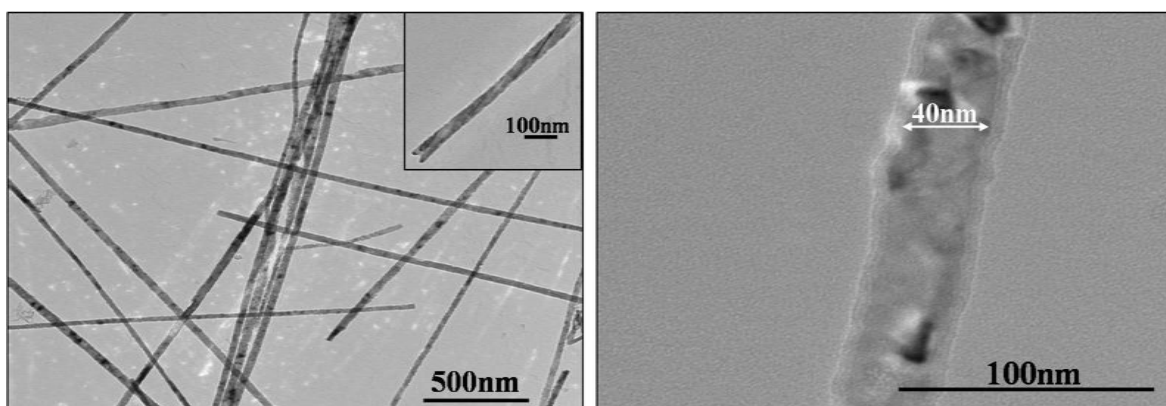


Figura II.2- Imagens de TEM dos nanofios de níquel sintetizados por eletrodeposição.

Na Figura II.2 são apresentadas imagens de TEM de nanofios de Ni. As imagens de TEM permitem evidenciar a presença de uma camada fina homogénea em torno dos nanofios, com uma espessura média de 4 nm. Segundo a literatura, esta camada pode ser devida à

formação de óxido de Ni(II) logo após a síntese dos nanofios, podendo ser facilitada no processo de purificação que envolve lavagens com KOH, NaOH ou etanol, ou do contacto com o ar e a água, uma vez que ao longo desta investigação foram usados sempre em solução aquosa.⁴⁸ Segundo a literatura, o mecanismo de formação desta camada de óxido pode ser explicada pela adsorção na superfície do níquel de moléculas de oxigénio, que se decompõe em oxigénio atómico. O oxigénio atómico liga-se covalentemente aos átomos de níquel metálico da superfície, enfraquecendo as ligações Ni-Ni, levando à formação da camada de óxido. Os eletrões provenientes da oxidação do níquel criam um campo elétrico induzindo o movimento dos iões níquel através da camada de óxido até à superfície, levando ao aumento da espessura da camada de óxido. No entanto, a partir de uma determinada espessura, o campo elétrico já não é forte o suficiente para promover a difusão dos iões, terminando a oxidação espontânea.⁵⁶⁻⁵⁸ A literatura esclarece que a camada de óxido de níquel da superfície é constituída por espécies bivalentes e trivalentes de Ni(II) e Ni(III), respetivamente. Como se poderá constatar por resultados apresentados mais à frente, a camada superficial de óxido de Ni não limita a funcionalização dos nanofios de Ni segundo a estratégia adotada nesta investigação.

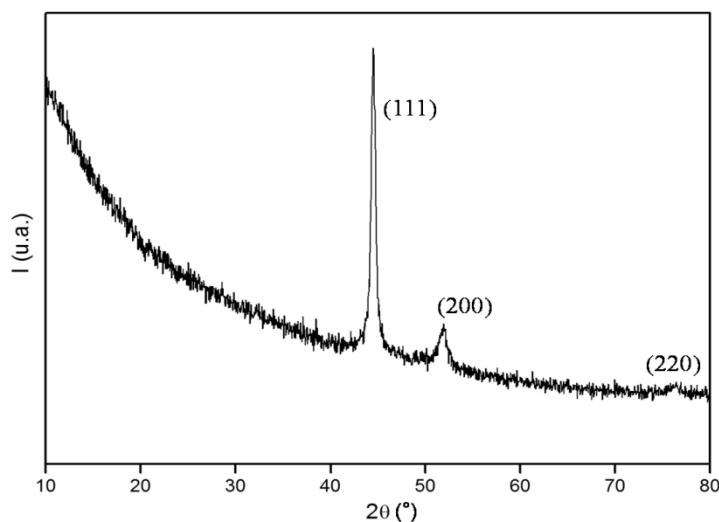


Figura II.3- Difratoograma de Raios X de pós dos nanofios de níquel sintetizados por eletrodeposição.

As fases cristalinas presentes nos nanofios de Ni foram identificadas por difração de raios X de pós. A Figura II.3 mostra um difratograma de raios X de pós dos nanofios de Ni sintetizados por eletrodeposição em molde. Os picos de difração da amostra a $2\theta = 44.5^\circ$, $2\theta = 51.7^\circ$ e $2\theta = 76.1^\circ$ são representativos da estrutura cúbica de faces centradas do níquel, indicando a presença de níquel metálico (JCPDS card NO. 04-0850).⁴⁹ O pico mais intenso

(111) deve-se à anisotropia de forma das partículas, refletindo o crescimento preferencial segundo este plano cristalográfico.

No difratograma de raios X aparecem apenas os picos característicos de níquel metálico, não havendo qualquer evidência da presença de óxido de níquel. No entanto, a camada de óxido de Ni referida anteriormente poderá ter natureza amorfa, pelo que estes resultados não contradizem a análise por TEM.

III. Modificação química superficial de nanofios de níquel

Neste capítulo é abordada a modificação do PEI com o FITC (PEI-FITC) e respectiva caracterização. Foi usada a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) para identificar a banda associada ao modo vibracional da ligação covalente do tipo tioureia que é estabelecida e a espectroscopia de fluorescência para verificar a formação do conjugado PEI-FITC através do máximo da banda de emissão do FITC. Descrevem-se os resultados obtidos relativamente à modificação dos nanofios de níquel funcionalizados com o PEI-FITC. Os nanofios modificados foram caracterizados por microscopia eletrónica com o objetivo de observar potenciais alterações morfológicas. Usaram-se ainda técnicas de fluorescência para detetar a modificação dos nanofios com PEI-FITC através da emissão de fluorescência do FITC.

1. Funcionalização do polieletrólito com o fluoróforo FITC

A modificação dos nanofios de Ni envolve num primeiro passo a funcionalização do polieletrólito PEI com o fluoróforo FITC numa reação à temperatura ambiente e a pH 11. De acordo com a literatura, esta reação ocorre idealmente a pH alcalino, ao qual os grupos aminas se encontram desprotonados.⁵⁰ Neste trabalho foi usado PEI ramificado, uma vez que apresenta grupos amina terciários (não apresenta hidrogénios ligados), secundários (-NH) e primários (-NH₂), enquanto o PEI linear apenas contém grupos secundários.⁴² O grupo isotiocianato do FITC reage com nucleófilos, por exemplo aminas, sendo neste caso o produto final mais estável da reação com aminas primárias.⁵⁰ A reação envolve ataque do nucleófilo ao átomo de carbono do grupo isotiocianato, dando origem a uma ligação do tipo tioureia entre o carbono do grupo isotiocianato do FITC e as aminas primárias do polieletrólito (Figura III.1).

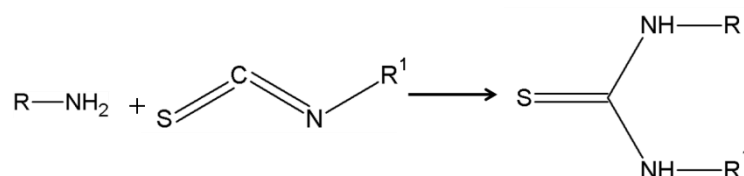


Figura III.1- Reação entre grupo amina do polieletrólito e o grupo isotiocianato do FITC, com formação do grupo tioureia.

Após a modificação do PEI com FITC, o conjugado obtido foi purificado utilizando a técnica de separação por diálise contra água.³⁹ O máximo da banda de emissão de fluorescência do FITC ocorre a 519 nm, e o $\lambda_{\text{exc}}=494$ nm. Deste modo, a diálise foi seguida por espectroscopia de fluorescência do dialisato, monitorizando a banda a 519 nm. No entanto, este processo mostrou-se muito demorado (cerca de um mês), tendo sido necessária a sua otimização. O processo foi repetido usando tampão PBS a pH 7.4 em vez de água, verificando-se uma diminuição do tempo da diálise (10 dias). Tal pode dever-se à maior solubilidade do FITC neste tampão em relação à água, traduzindo-se num maior índice de difusão do FITC de dentro para fora da membrana. Na Figura III.2 está representado o gráfico que mostra a evolução do processo de diálise em tampão PBS a pH 7.4. O dialisato foi trocado todos os dias durante um período de 10 dias. Com o tempo, verifica-se uma diminuição da intensidade de fluorescência do dialisato, o que significa que no final praticamente todo o FITC livre foi removido.

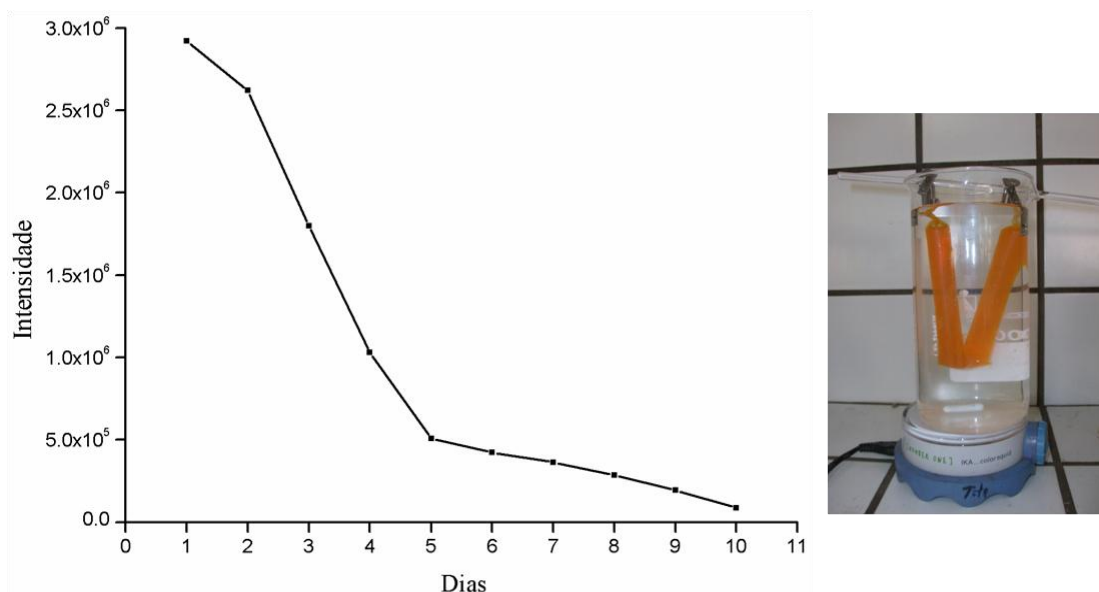


Figura III.2- Monitorização da intensidade da banda de emissão a 519 nm do dialisato, ao longo da diálise em PBS pH 7.4. Fotografia da montagem experimental (à direita).

As propriedades do polieletrólito modificado com FITC foram estudadas pelas técnicas de FTIR-ATR e espectroscopia de fluorescência.

A Figura III.3 mostra os espectros de fluorescência do FITC e do PEI-FITC, obtidos com a linha de excitação a 494 nm.

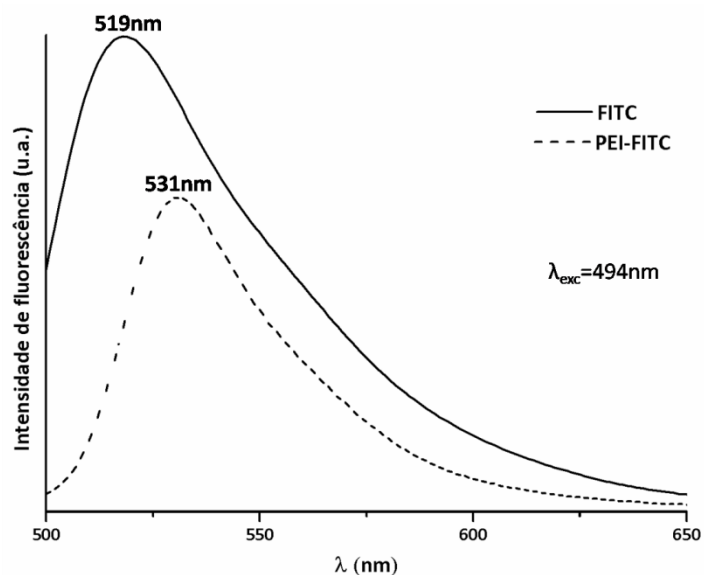


Figura III.3- Espectros de fluorescência do FITC e do PEI-FITC. Espectros obtidos em soluções com pH 7.49 e 7.52, respetivamente.

A análise dos espectros de fluorescência do FITC e do PEI-FITC em solução aquosa indica um desvio no máximo de emissão para maiores comprimentos de onda do PEI-FITC em

relação ao FITC, respetivamente 519 nm e 531 nm. Trata-se de um desvio batocrómico, que se caracteriza pela alteração da posição da banda em espectros moleculares para comprimentos de onda superiores. Neste caso, este desvio ocorre devido a alterações estruturais do fluoróforo resultantes da sua funcionalização com o PEI.⁵¹ Esta diferença no comprimento de onda do máximo de emissão dos dois compostos (FITC e PEI-FITC) confirma a funcionalização do PEI pelo FITC. No entanto, a funcionalização do PEI com FITC foi ainda confirmada por FTIR-ATR, pela identificação da banda vibracional indicativa da ligação covalente entre o FITC e o PEI.

Os espectros de FTIR-ATR do PEI/FITC e do PEI foram obtidos na gama de números de onda entre 2000-500 cm^{-1} (Figura III.4).

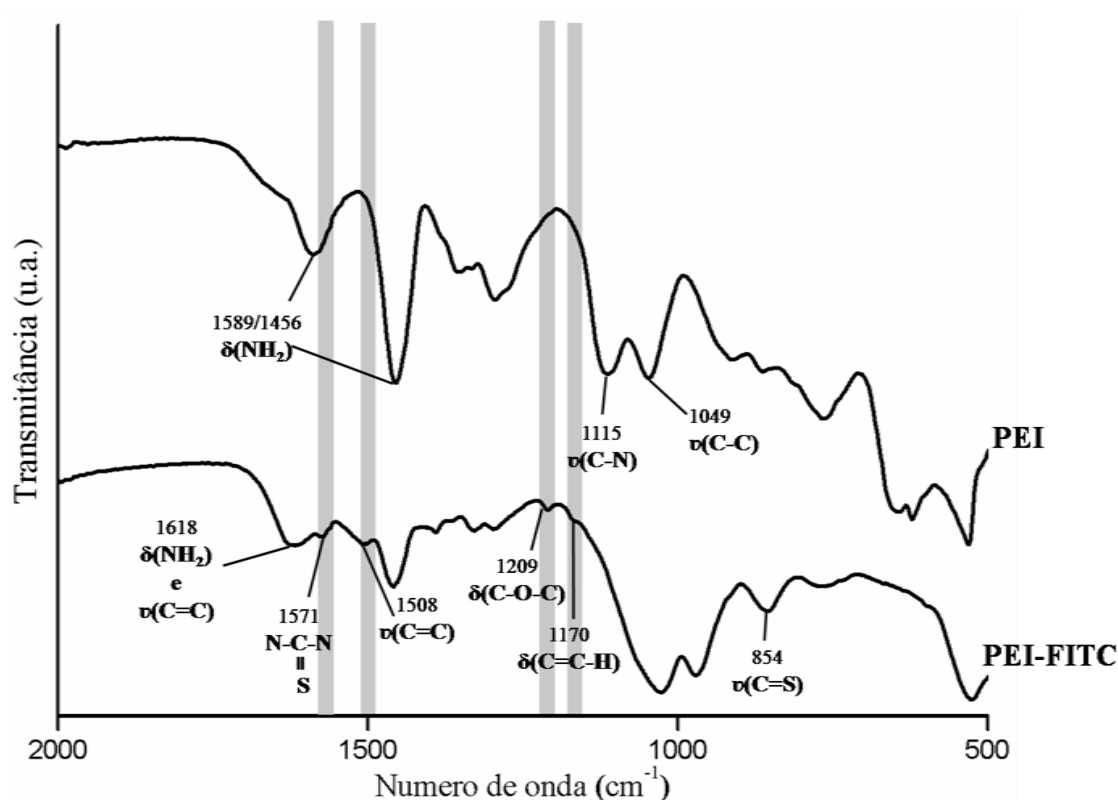


Figura III.4- Espectro de FTIR do PEI e do PEI-FITC, obtidos na gama de números de onda entre 2000-500 cm^{-1} .

De facto, no espectro de FTIR do PEI-FITC surgem algumas bandas que indicam a conjugação do polieletrólito com o fluoróforo. As bandas mais evidentes que traduzem esta conjugação estão a sombreado. A ligação covalente do PEI ao FITC é evidenciada pela formação de uma ligação tipo tioureia, cuja banda vibracional característica surge a 1571 cm^{-1} . Este resultado encontra-se concordante com resultados de outros autores para este

tipo de funcionalização.⁵² A banda de vibração a 854 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongação da ligação C=S e a banda a 1209 cm^{-1} resultam da vibração de deformação angular da ligação C-O-C. Estas vibrações são características da molécula de FITC e confirmam a presença de FITC no conjugado PEI-FITC. Além disso, também a banda a 1508 cm^{-1} correspondente à vibração de alongação da ligação C=C e a banda que surge a 1170 cm^{-1} devido à vibração de deformação angular da ligação C=C-H indicam a presença do FITC. Por outro lado, a banda a 1618 cm^{-1} do espectro PEI-FITC apresenta-se desviada em relação à banda 1589 cm^{-1} e mais larga. Isto pode ser explicado pela contribuição da vibração de alongação da ligação C=C característica do FITC, para além da vibração de deformação angular da ligação N-H dos grupos amina do PEI.⁵³⁻⁵⁴

O desvio das bandas de transmitância correspondentes às vibrações C-N e C-C características do PEI, a 1115 cm^{-1} e 1049 cm^{-1} , respetivamente, para menores valores de número de onda (1026 cm^{-1} e 966 cm^{-1} , respetivamente) pode dever-se à proximidade com o anel xanteno do FITC. De facto, os efeitos eletrónicos de grupos vizinhos e de ligações de hidrogénio afetam significativamente a banda de vibração de uma ligação covalente.⁵³⁻⁵⁴

A Figura III.5 mostra em detalhe os espectros de FTIR-ATR do PEI/FITC e do FITC obtidos na gama de números de onda entre $2200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$.

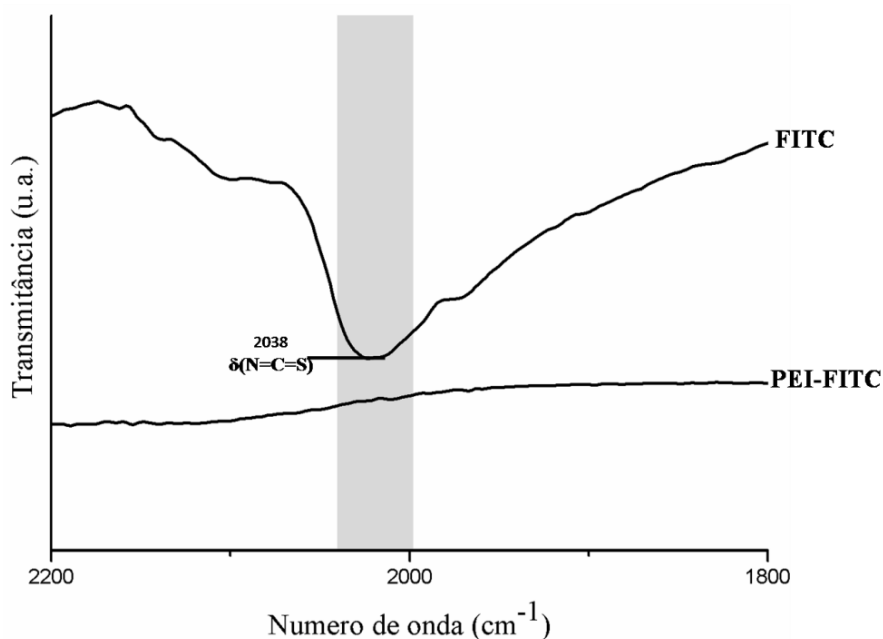


Figura III.5- Espectro de FTIR do FITC e do PEI-FITC, obtidos na gama de números de onda entre $2200\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$.

Na Figura III.5 é de salientar a ausência da banda correspondente ao modo vibracional $\delta(\text{NCS})$, característico do grupo isotiocianato, no espectro FTIR do PEI-FITC. Trata-se de uma confirmação adicional da conjugação do FITC ao PEI pois a modificação do FITC com o PEI envolve o grupo isotiocianato.

2. Modificação de nanofios de Ni com PEI-FITC

Após a síntese e purificação dos nanofios de Ni, mediu-se o potencial zeta de suspensões aquosas contendo estes materiais. O valor obtido foi de $\zeta = -33.5 \pm 4.35$ mV, a pH=6, o que permite a adsorção de um polieletrólito positivo, como é o caso do PEI. Após o processo de modificação da superfície dos nanofios com PEI-FITC verificou-se um valor de potencial zeta positivo ($\zeta = +49.8 \pm 11.5$ mV), a pH=6, o que sugere a presença do PEI-FITC nos nanofios. As interações que se estabelecem entre o polieletrólito e a superfície dos nanofios têm caráter predominantemente eletrostático. No entanto, neste caso, também podem ocorrer interações não-eletrostáticas, como as ligações de hidrogénio entre grupos OH presentes à superfície dos nanofios e os grupos amina do PEI, que não ligaram ao FITC (Figura III.6).⁵⁵

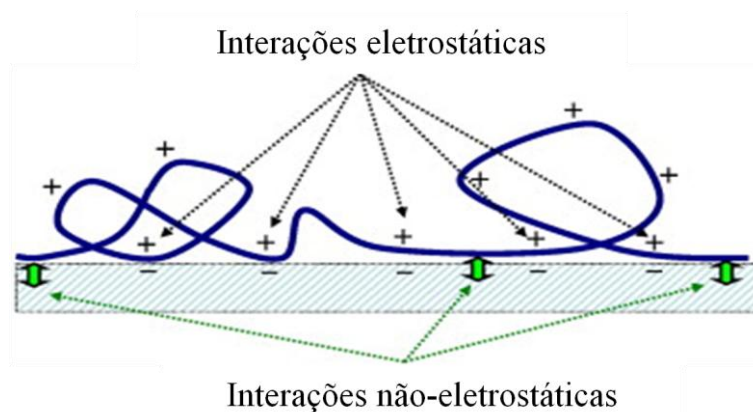


Figura III.6- Representação das interações eletrostáticas e não-eletrostáticas que se estabelecem entre os nanofios de Ni e o PEI-FITC. Adaptado da literatura.⁵⁵

Os nanofios modificados foram caracterizados por SEM, por espectroscopia de fluorescência e por microscopia ótica de fluorescência.

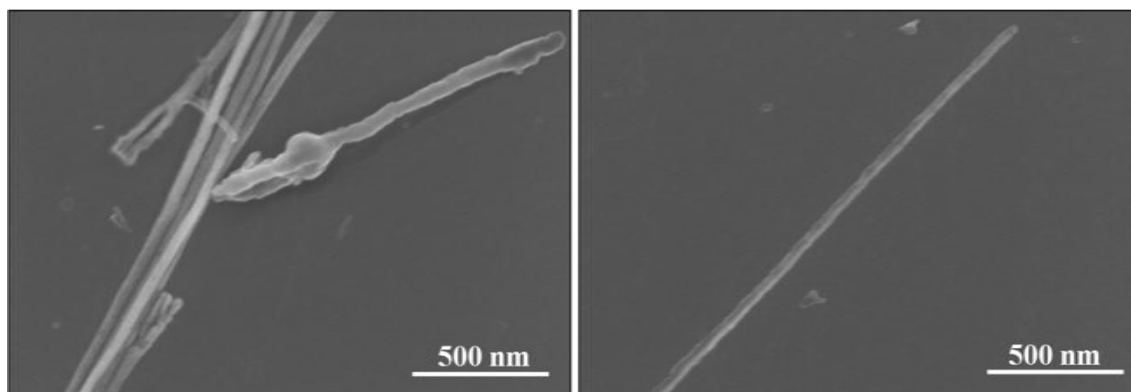


Figura III.7- Imagens de SEM de nanofios de Ni modificados com PEI-FITC.

As imagens de SEM dos nanofios de Ni modificados com PEI-FITC (Figura III.7) dão-nos informação acerca da morfologia dos nanofios modificados. Com base nestas imagens não se verifica alterações morfológicas significativas dos nanofios devido à sua modificação superficial. De modo a obter o máximo de informação possível que esta técnica de caracterização permite obter, procedeu-se ao mapeamento dos elementos presentes nos nanofios por SEM-EDX. Analisou-se com mais pormenor o sinal do enxofre (S), cuja presença evidencia a funcionalização superficial dos nanofios com PEI-FITC, uma vez que a única fonte de enxofre neste material é o FITC.

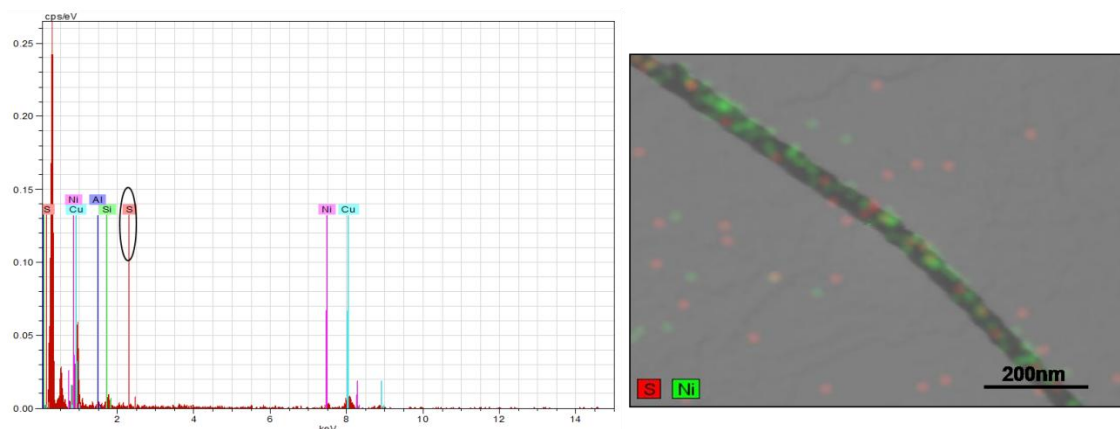


Figura III.8- Espectro de EDX dos nanofios de Ni funcionalizados com PEI-FITC (a) e mapeamento do S nos nanofios por SEM-EDX (b).

O espectro de EDX dos nanofios de Ni permitiu a identificação dos elementos presentes na amostra, tal como indicado (Figura III.8). O enxofre foi identificado nos nanofios de níquel o que evidencia a presença de FITC na superfície dos nanofios com PEI-FITC. Além disso, recorreu-se ao mapeamento por SEM-EDX da amostra, o que gera mapas composicionais dos elementos desejados. O enxofre foi também identificado fora dos nanofios, o que pode

dever-se à dispersão do polieletrólito no suporte. Por outro lado, também o Ni foi identificado fora dos nanofios. Isto traduz algumas limitações deste tipo de mapeamento, tendo em conta que se baseia nos elementos identificados no espectro de EDX, servindo apenas como auxiliar para caracterização qualitativa e não quantitativa.

Na Figura III.9 são apresentados os espectros de fluorescência de soluções com nanofios modificados com PEI-FITC e tratados com solução de FITC. Esta última amostra foi analisada para servir como termo de comparação.

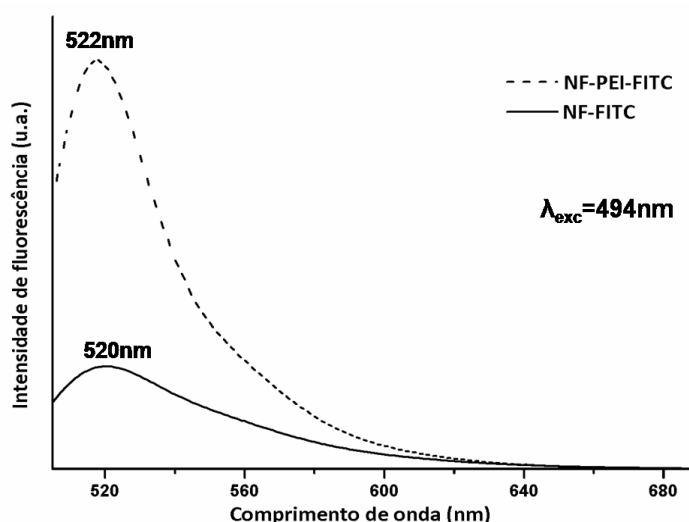


Figura III.9- Espectros de fluorescência dos nanofios tratados com FITC (amostra NF-FITC) e funcionalizados com PEI-FITC (amostra (NF-PEI-FITC)). Espectros obtidos em soluções com pH 6.52 e 6.40, respetivamente.

A presença de um máximo de fluorescência na amostra de nanofios modificados com PEI-FITC (NF-PEI-FITC) confirma mais uma vez a funcionalização superficial dos nanofios de Ni. Observa-se novamente a presença de um desvio do comprimento de onda do máximo de emissão dos nanofios com PEI-FITC em relação aos nanofios apenas com FITC. No entanto, este desvio não é tão evidente como no caso dos compostos FITC e PEI-FITC isolados (Figura III.3).

Para complementar a informação de que a fluorescência das amostras de Ni se deve à presença de FITC, foram ainda obtidas imagens de microscopia ótica de fluorescência (Figura III.10).

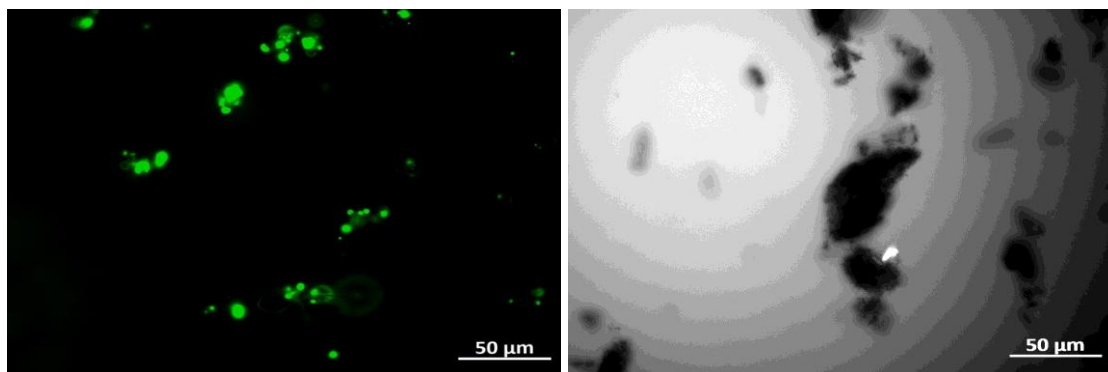


Figura III.10- Imagens de microscopia ótica de fluorescência dos nanofios modificados com PEI-FITC: a) modo de fluorescência ($\lambda_{ex}= 537$ nm); b) modo de transmissão.

A cor verde observada na amostra NF-PEI-FITC quando excitada a 537 nm confirma que a fluorescência se deve à presença de FITC (Figura III.10-a). A imagem de transmissão revela a presença de aglomerados de nanofios funcionalizados nas áreas marcadas a verde (Figura III.10-b). Esta agregação pode dever-se ao excesso de polieletrólito usado para modificar a superfície dos nanofios resultando numa suspensão pouco estável, ou pode ter sido induzida magneticamente, devido à aplicação do campo magnético no processo de separação.

Conclui-se que a funcionalização do polieletrólito PEI com FITC foi bem sucedida, bem como a sua utilização posterior na modificação da superfície dos nanofios de Ni. Certamente nem todos os grupos amina do PEI foram funcionalizados, o que permite a ligação de biomoléculas com grupos reativos como os carboxílicos. Os anticorpos apresentam grupos carboxílicos disponíveis para formar ligações com outras moléculas e conferem especificidade aos sistemas que constituem. Este tema será abordado no capítulo seguinte.

IV. Interação de nanofios de Ni funcionalizados com sistemas biológicos

Nesta secção são apresentados os resultados preliminares da aplicação dos nanofios de Ni funcionalizados em métodos de separação celular. Nesta fase, o processo foi seguido por microscopia ótica de fluorescência. Os estudos foram desenvolvidos em colaboração com Professor Doutor Jorge Guiomar do Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra.

A funcionalização de nanofios de Ni com polímeros permite a conjugação de sistemas biológicos, como é o caso de anticorpos. Nesta parte do trabalho, pretendeu-se fazer a prova de conceito, demonstrando a aplicação e compatibilidade dos nanofios de Ni funcionalizados em sistemas biológicos. Tendo em conta o interesse crescente na área de separação celular decidiu-se aplicar estes sistemas neste campo.

Neste sentido, os nanofios de Ni modificados com PEI-FITC foram conjugados a um anticorpo (AC) que se liga especificamente às plaquetas de sangue bovino. O anticorpo utilizado foi o anticorpo monoclonal de rato anti-CD61 suíno. Este anticorpo exhibe reatividade cruzada com oCD61 bovino, que é um antígeno que existe à superfície de plaquetas (e de megacariócitos, que são os precursores das plaquetas). O uso de plaquetas permite facilmente a sua obtenção por centrifugação e, para além disso, a sua morfologia característica permite que facilmente sejam distinguidas microscopicamente das restantes células. As plaquetas apresentam-se como células anucleadas com forma de discos achatados e diâmetro aproximado de 3 μm (Figura IV.1).⁵⁶

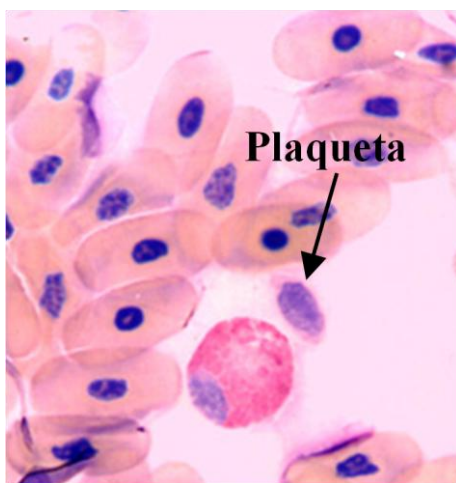


Figura IV.1- Fotomicrografia de células sanguíneas. Adaptado da literatura.⁵⁶

A conjugação do anticorpo aos nanofios modificados foi promovida pela ligação dos grupos amina do PEI, que não ligaram o FITC, aos grupos carboxílicos do anticorpo, formando ligações tipo amida. Esta reação é mediada por uma carbodiimida, que atua como agente de reticulação e designam-se por reagentes *zero-length* uma vez que a reação que promovem não envolve mudanças na conformação química da estrutura.⁵⁰ Utilizou-se neste caso a hidrocloreto de 1-etil-(3-3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC). A ação do EDAC é promover a reação de ativação do grupo carboxílico do anticorpo, formando-se

um intermediário muito reativo. Este intermediário sofre ataque de um nucleófilo contendo um grupo amina primário, formando a ligação amida.⁵⁰ O processo de conjugação do AC ao PEI nos nanofios, encontra-se indicada na Figura IV.2.

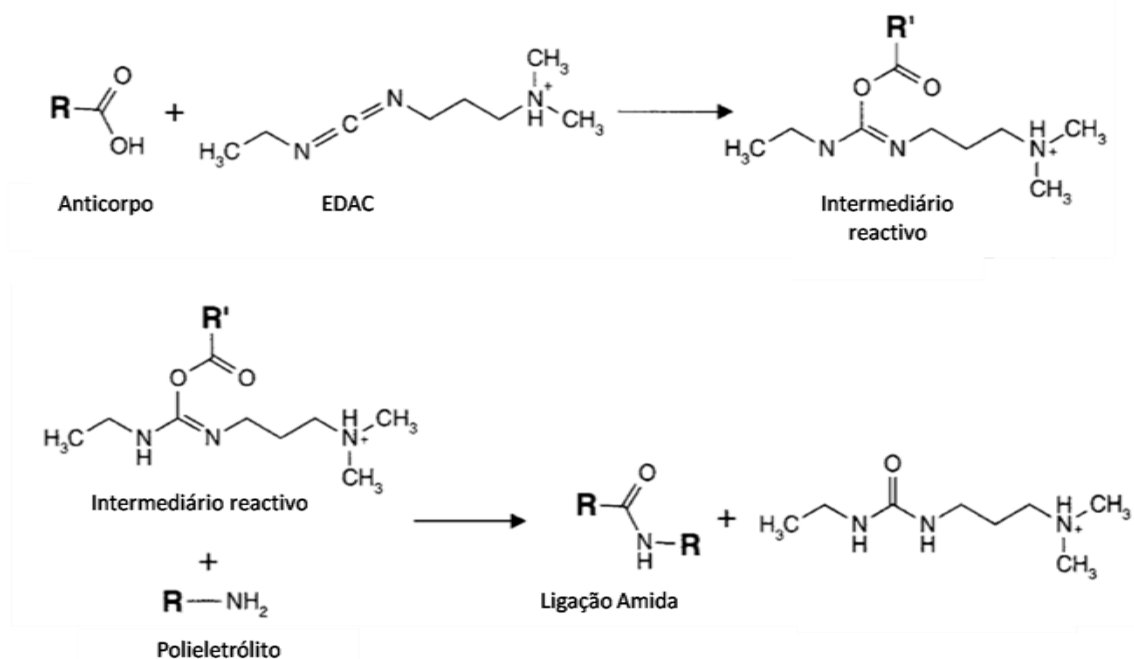


Figura IV.2- Representação da reação do anticorpo com os grupos amina do PEI, promovida pela EDAC. Adaptado da literatura.⁵⁰

Esta reação ocorre preferencialmente a valores de pH 4-6, tendo sido por isso usado como solvente uma solução aquosa tamponizada a pH 5.5.

A primeira etapa dos testes de separação celular foi a realização de um teste de controlo, como objetivo de verificar que os nanofios funcionalizados com PEI-FITC sem anticorpo não se ligavam às células. Isto permite avaliar a importância da interação não específica entre os nanofios e as células, isto é por adsorção química. Este aspeto é muito relevante pois o PEI é catiónico e as células têm carga negativa na superfície externa da membrana. Para tal, foram promovidas as condições ideais para a ligação dos nanofios às células, tendo sido incubados durante 1h à temperatura ambiente. Foram realizados dois métodos de separação no fim do tempo da incubação: separação por centrifugação e separação magnética. Este último tira vantagem das propriedades ferromagnéticas dos nanofios de níquel.

As amostras separadas magneticamente e por centrifugação foram caracterizadas por microscopia ótica de fluorescência, sendo apresentadas na Figura IV.3 e Figura IV.4 as respectivas imagens. Recorde-se que a presença de FITC na superfície dos nanofios de Ni modificados permite a sua marcação por fluorescência no verde.

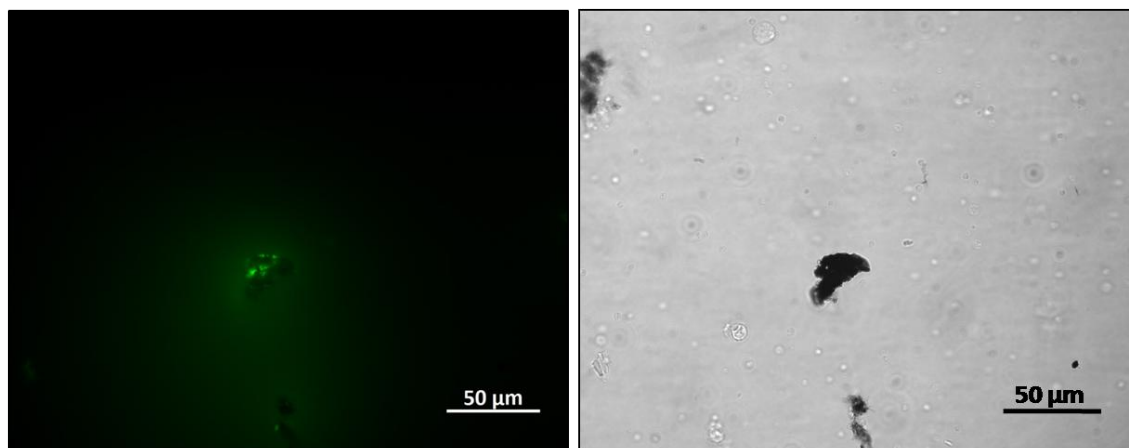


Figura IV.3- Imagens de microscopia ótica de fluorescência das amostras obtidas por separação magnética: a) modo de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 537 \text{ nm}$); b) modo de transmissão.

As imagens de microscopia ótica de fluorescência permitem verificar que, tal como esperado, a amostra separada magneticamente contém principalmente nanofios de níquel que apresentam fluorescência verde quando excitados a 537 nm (Figura IV.3-a). No entanto, verifica-se também a presença de algumas plaquetas (pontos brancos na Figura IV.3-b com diâmetro 3 μm) mas sem fluorescência. Isto sugere que não contêm nanofios ligados à sua superfície e portanto não foram separadas magneticamente, tendo sido provavelmente arrastadas por agregados de nanofios.

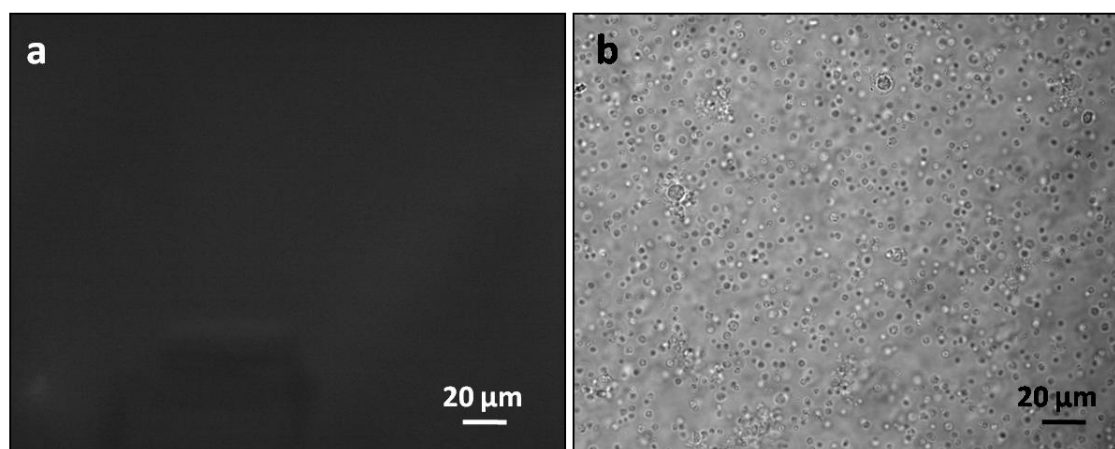


Figura IV.4- Imagens de microscopia ótica de fluorescência das amostras obtidas por centrifugação: a) modo de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 537 \text{ nm}$); b) modo de transmissão.

A Figura IV.4 apresenta imagens de microscopia ótica da amostra obtida após centrifugação. Tendo em conta que esta amostra contém apenas plaquetas (Figura IV.4-b) não marcadas com FITC (Figura IV.4-a), conclui-se que estas plaquetas não foram conjugadas aos nanofios magnéticos modificados. Podemos assim concluir que não se verificou a ligação dos nanofios às plaquetas na ausência do anticorpo específico.

Após o estudo preliminar descrito anteriormente, testou-se a aplicação dos nanofios de Ni-FITC-PEI-AC em separação celular. Assim, os nanofios funcionalizados foram incubados com as plaquetas durante 1h, à temperatura ambiente e sob agitação, tendo sido posteriormente separados da solução por separação magnética (Figura IV.5).

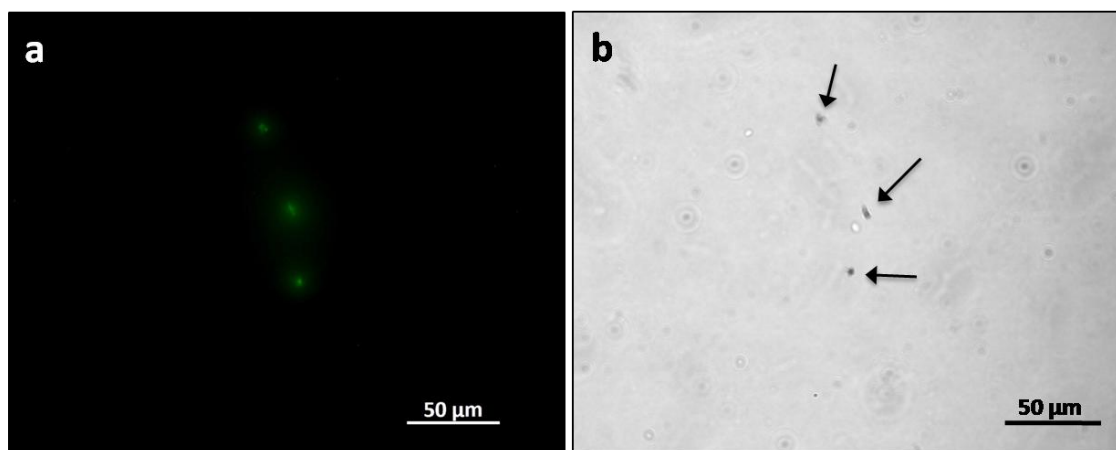


Figura IV.5- Imagens de microscopia ótica de fluorescência usando nanofios FITC-PEI-AC: a) modo de fluorescência ($\lambda_{ex}= 537$ nm); b) modo de transmissão. Amostra obtida por separação magnética.

Na Figura IV.5 verifica-se a fluorescência devido ao FITC em três zonas, que estão assinaladas com setas. A imagem de transmissão sugere semelhanças com as plaquetas sanguíneas quanto à forma, sugerindo ainda a presença de nanofios na superfície uma vez que se apresentam como zonas escuras, tal como os nanofios se apresentam em imagens de microscopia de fluorescência em modo de transmissão anteriores. Esta observação sugere a ligação específica dos nanofios FITC-PEI-AC à superfície das plaquetas.

Estes resultados são promissores em relação à aplicação dos nanofios de níquel magnéticos funcionalizados com o polieletrólito PEI e o fluoróforo FITC na área de separação e marcação celular. O facto de este polieletrólito apresentar um elevado número de grupos amina permite a conjugação do FITC e do AC. E a presença do FITC é importante pois permite a biomarcação e, eventualmente, a quantificação das células marcadas.

No entanto, é necessário otimizar a estabilidade do polieletrólito na superfície dos nanofios, tendo em conta o elevado número de ciclos de lavagens necessários nestes estudos de separação celular. Neste sentido, foram realizados estudos preliminares utilizando tampões de interesse biológico usados no procedimento de ligação dos anticorpos. Os resultados são apresentados nas Figuras IV.6, IV.7 e IV.8. O processo de lavagem foi seguido por fluorescência e a amostra de nanofios após os ciclos de lavagem foi caracterizada por SEM, tendo sido obtido o espectro EDX dos elementos presentes nas amostras.

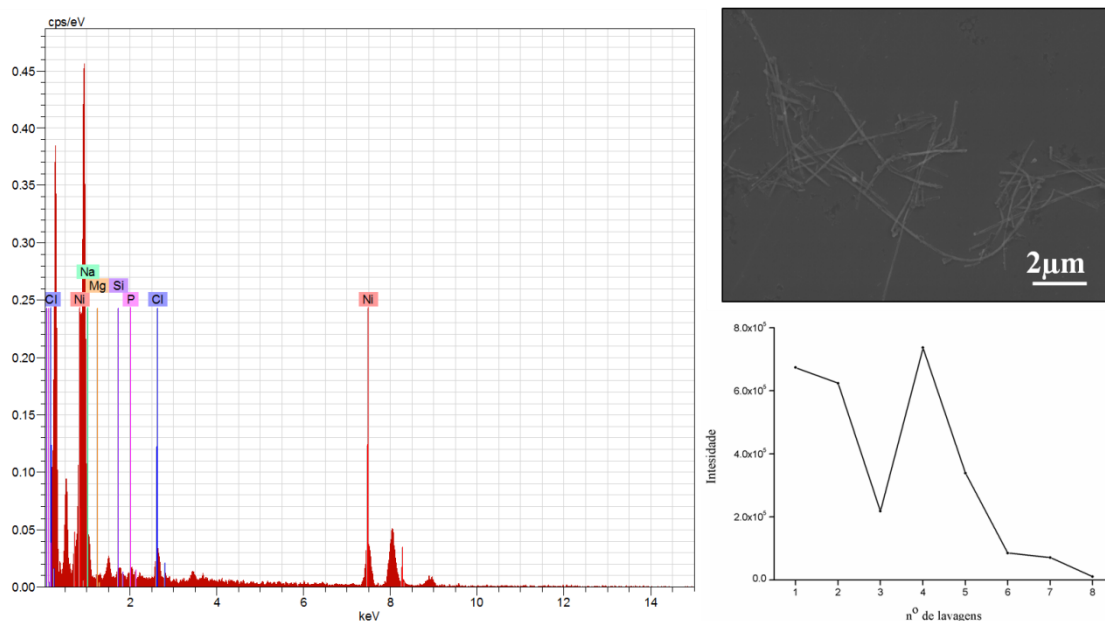


Figura IV.6- Caracterização da amostra de nanofios com PEI-FITC após lavagens com tampão Tris pH 7.4, por SEM, EDX e fluorescência.

Os resultados apresentados na Figura IV.6 resultam do processo de lavagem utilizando tampão Tris a pH 7.4. Os dados do espectro de EDX e do gráfico de monitorização da intensidade da banda de emissão a 519 nm do sobrenadante em função no número de lavagens são concordantes. O gráfico de monitorização das lavagens indica que a solução que se obtém no final das lavagens não apresenta fluorescência, e o espectro de EDX também não revela a presença de S, proveniente do FITC. Ambos indicam que não existe FITC na amostra após as várias lavagens efetuadas. É importante referir que este resultado é uniforme para toda a amostra, uma vez que o mapeamento foi efetuado para várias zonas com nanofios, tendo sido aqui apresentado o resultado obtido da análise de apenas uma zona.

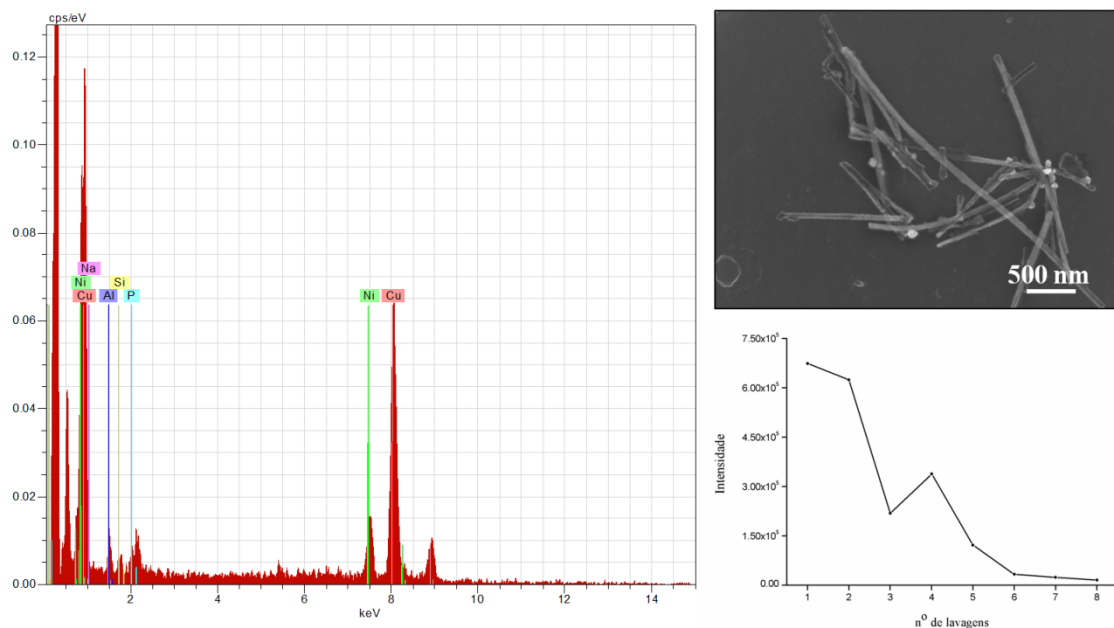


Figura IV.7- Caracterização da amostra de nanofios com PEI-FITC após lavagens com tampão Fosfato pH 5.5, por SEM, EDX e fluorescência.

Os resultados apresentados na Figura IV.7 resultam do processo de lavagens utilizando tampão pH 5.5. Mais uma vez se verifica que os dados do espectro de EDX e do gráfico de monitorização da intensidade da banda de emissão a 519 nm de fluorescência do sobrenadante em função no número de lavagens são concordantes. Ambos indicam que não existe FITC na amostra após as diversas lavagens efetuadas.

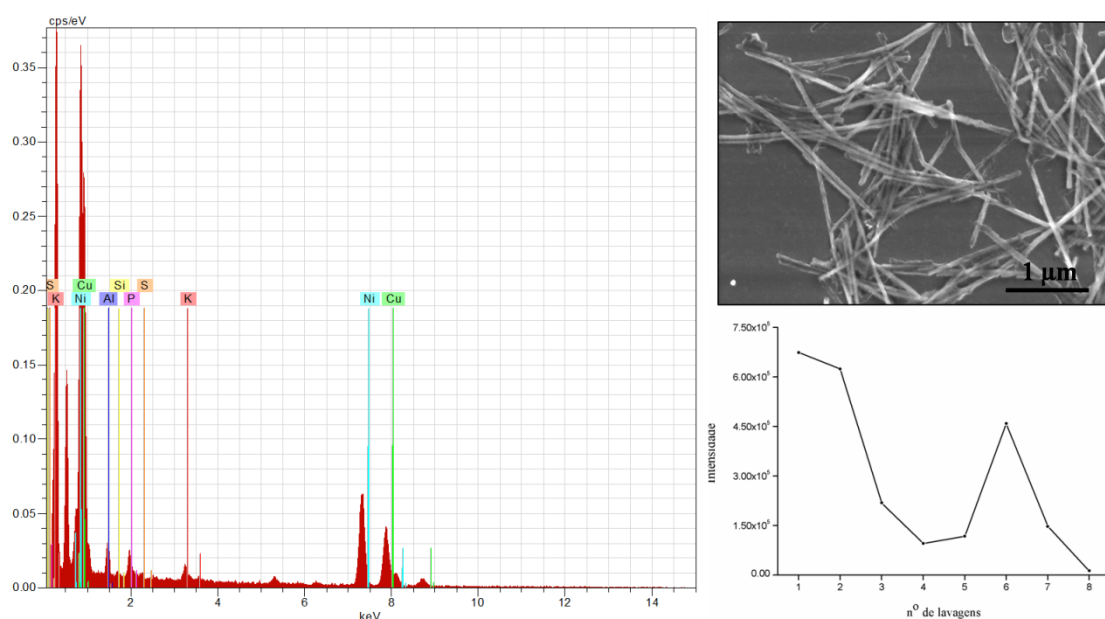


Figura IV.8- Caracterização da amostra de nanofios com PEI-FITC após lavagens usadas na ligação do anticorpo, por SEM, EDX e fluorescência.

Os resultados da Figura IV.8 foram obtidos após o ciclo de lavagens correspondente ao processo de imobilização do anticorpo na superfície dos nanofios de Ni. Neste caso também se verifica que, durante o processo de lavagens, o PEI-FITC é removido da superfície dos nanofios. A solução de nanofios final que se obtêm não apresenta fluorescência e os nanofios não contêm S. É importante referir que o aumento significativo da fluorescência do sobrenadante que se verifica na lavagem 6 se deve à troca de tampão, do tampão fosfato pH 5.5 para o tampão Tris pH 7.4, indicando que o FITC é mais solúvel neste último. A utilização de tampões durante o processo de lavagens resulta na introdução de sais na amostra, como se pode verificar pelos espectros de EDX, que indicam a presença de fósforo (P), potássio (K) e sódio (Na).

Os resultados obtidos após o processo de lavagem carecem de confirmação posterior. No entanto, salientam a relevância de se otimizarem as condições de utilização dos nanofios de Ni modificados em métodos de separação celular.

V. Conclusões

Neste trabalho demonstrou-se a possibilidade de modificar a superfície de nanofios de Ni com o polieletrólito PEI, tendo este sido previamente funcionalizado com o fluoróforo FITC. Os resultados obtidos sugerem que estas nanoestruturas modificadas podem ser usadas em bio-aplicações, tendo sido demonstrado a prova de conceito pela sua aplicação em separação magnética e marcação ótica de células.

Os nanofios usados ao longo desta dissertação foram sintetizados por eletrodeposição em molde de alumina nanoporosa confirmando estudos anteriores na utilização desta técnica para a preparação de nanofios de Ni com morfologia controlada. Verificou-se no entanto, que as imagens de TEM revelaram a presença de uma camada fina superficial com cerca de 4 nm de espessura, podendo tratar-se de uma camada de óxido de níquel formada no processo de purificação após a síntese dos nanofios. Por outro lado, o difratograma de raios-x de pó revela apenas a presença de uma fase cristalina do níquel metálico (cúbica de faces centradas), o que pode significar que a camada em torno dos nanofios seja óxido de níquel amorfo. No entanto, são necessários estudos adicionais por XPS para confirmar a natureza desta camada.

Os nanofios de Ni foram posteriormente funcionalizados à superfície com PEI modificado com FITC. A conjugação do PEI com FITC ocorre por formação de uma ligação do tipo toureia, que foi confirmada por FTIR-ATR pelo aparecimento de uma banda corresponde ao modo vibracional característico deste grupo. A modificação dos nanofios de Ni iniciais foi conseguida por adsorção do PEI-FITC à superfície, tendo sido evidenciada por espectroscopia de fluorescência, microscopia ótica de fluorescência e pelo mapeamento via SEM-EDX de enxofre na superfície dos nanofios. O potencial zeta permitiu também verificar a alteração da carga à superfície de valores negativos para valores positivos, o que indica a presença do PEI.

Na fase final deste trabalho, foi demonstrada a possibilidade de aplicar *in vitro* estas nanoestruturas multifuncionais em sistemas biológicos, nomeadamente para separação magnética e biomarcação ótica de células. Tendo neste caso sido realizadas experiências envolvendo células sanguíneas de origem bovina (plaquetas) como sistemas modelo pela morfologia característica que permite a sua diferenciação das restantes células. Neste contexto, os resultados obtidos revelaram-se promissores no entanto indicam haver

necessidade de no futuro se otimizar o processo de bio-separação magnética, nomeadamente no que diz respeito ao processo de purificação utilizando soluções tampão.

VI. Experimental

1. Reagentes

Os solventes e reagentes químicos utilizados no decorrer deste trabalho foram adquiridos a várias empresas e foram usados sem qualquer purificação prévia.

Os reagentes: Ácido perclórico (Aldrich, 60%), etanol (Aldrich, 99%), ácido oxálico (Aldrich, 99%), ácido crômico (Aldrich, 99%), ácido fosfórico (Aldrich, 85%), monossulfato de níquel hexa-hidratado (Aldrich, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%), cloreto de Ni(II) hexa-hidratado (Aldrich, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%), ácido bórico (Aldrich, H_3BO_3 , 99%), sulfato de cobre (Aldrich, CuSO_4 , 99%), fosfato de sódio dibásico (Aldrich, Na_2HPO_4 , Mw= 141.96 g/mol), fosfato de sódio monobásico (Aldrich, NaH_2PO_4 , Mw= 119.98 g/mol), trizma (Aldrich, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, Mw= 121.14 g/mol).

O polímero utilizado: polietilenoimina (Aldrich, PEI Ramificado, Mw= 25 kDa); a carbodiimida utilizada: hidrocloreto de 1-etil-(3-3-dimetilaminopropil) carbodiimida (Aldrich, EDAC, Mw= 191.70 g/mol); o anticorpo usado: Anticorpo monoclonal de ratinho anti-CD61 suíno (AbDSerotec); o fluoróforo usado: Isotiocianato de fluoresceína (Alfa Aesar, FITC- isómero 1, 95%).

2. Procedimento Experimental

2.1. Síntese dos nanofios de Ni por eletrodeposição

2.1.1. Formação da camada de alumina porosa anódica

As membranas de alumina porosa foram preparadas a partir da anodização de folhas de alumínio de pureza 99.997 %, num processo de duas etapas. Antes da anodização as folhas de alumínio foram cortadas em quadrados de 2.25 cm^2 , lavadas com acetona, etanol e água ultrapura (5 min no ultrassons) e secas sob fluxo de azoto. De seguida, o alumínio foi submerso numa solução de ácido perclórico e etanol sendo aplicado um potencial de 20 V, durante 2 min. O sistema eletroquímico de anodização utilizado consistiu numa célula eletrolítica contendo uma solução aquosa de ácido oxálico 0.3 M, como eletrólito, em que o próprio substrato de alumínio é o ânodo e um eletrodo de platina é o cátodo. As

anodizações foram conduzidas à temperatura de 4.0 ± 0.1 °C, controlada por um banho termostatzado e realizadas com a aplicação de um potencial de 40.0 ± 0.1 V. O tempo da primeira anodização foi de 24 h. Após a primeira anodização, a alumina nanoporosa formada na superfície do substrato de alumínio anodizado foi dissolvida numa solução aquosa de ácido fosfórico 0.4 M e ácido crômico 0.2 M a 70 °C, durante 2 h. A segunda anodização foi realizada nas mesmas condições que a primeira, mas por um período de 2 h para obter alumina nanoporosa com uma espessura de 5 µm (taxa de anodização nas referidas condições é 2.5 µm/h). Antes da eletrodeposição dentro dos poros da alumina, a barreira deste óxido presente no fundo dos poros foi reduzida, aplicando um potencial em exponencial desde 40 V até 8 V, o que leva à formação de pequenos poros chamados dendrites. Por fim, foram feitas sucessivas lavagens da amostra com água ultrapura.

2.1.2. Eletrodeposição

Foram sintetizados nanofios de níquel usando o método de eletrodeposição pulsada em membranas de alumina nanoporosa. A eletrodeposição é feita na mesma célula eletroquímica onde foi anodizado o alumínio, mas neste caso o substrato de alumínio é o cátodo e o eletrodo de platina é o ânodo. A eletrodeposição pulsada é feita aplicando sucessivamente três pulsos numa escala de milissegundos: o primeiro é um pulso positivo de corrente (70 mAcm^{-2}) durante 8 ms, o segundo pulso tem polaridade inversa (negativo) de 8 V aplicado durante 2 ms, e o último é um pulso de repouso de 700 ms (isento de corrente ou potencial). Usando este método de eletrodeposição pulsada foi depositado cobre nas dendrites com uma solução de 0.5 M CuSO_4 e 0,57 M H_3BO_3 à temperatura ambiente. De seguida, foi depositado o níquel a partir de uma solução de 1.3 M $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 M $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e H_3BO_3 a 40 °C. O níquel foi depositado usando uma solução comercial, Orosene 999, IncThec. O crescimento dos fios dentro dos poros da alumina nanoporosa é monitorizado medindo o potencial durante o processo de eletrodeposição. A membrana de alumina é dissolvida (usando a mesma solução que foi usada para dissolver a alumina da primeira anodização) e os nanofios sintetizados são libertados para a solução. Antes da suspensão dos nanofios na solução a estudar, estes são lavados com água ultrapura e etanol várias vezes. Finalmente os nanofios foram caracterizados por SEM e foi medido o seu potencial zeta.

2.2.Modificação superficial dos nanofios

2.2.1. Funcionalização do polieletrólito com o fluoróforo FITC

O PEI (312.6 mg) foi dissolvido em 30 mL de água ultrapura e foi posteriormente adicionado FITC (12.6 mg). O pH foi ajustado a pH 11. A solução ficou a agitar durante a noite e sob proteção da incidência de luz.

2.2.2. Modificação dos nanofios com PEI-FITC

A modificação superficial dos nanofios ocorreu a um pH 5.5 por isso foi necessário acertar o pH do PEI-FITC a 5.5. De seguida adicionou-se o PEI-FITC aos nanofios de Ni na proporção 1 mg nanofios para 1 mL de solução PEI-FITC. Deixou-se a agitar mecanicamente durante 1 h, utilizando um agitador mecânico com vareta de vidro, a 600 rpm.

2.3.Interação dos nanofios de Ni funcionalizados com as plaquetas

2.3.1. Teste controlo

No teste controlo criam-se as condições ideais de ligação entre os nanofios modificados com PEI-FITC e as células, mas sem o AC, para testar a ligação não específica. Para tal, são feitas várias suspensões de nanofios de concentração variável (1:10, 1:100 e 1:1000) em PBS/BSA a partir de uma suspensão de nanofios 1 mg/mL em PBS/BSA, mantendo-se a concentração de plaquetas nas soluções. Deixa-se a agitar à temperatura ambiente durante 1h. Por fim, separa-se os nanofios quer por separação magnética (Figura VI.1) quer por centrifugação (15 min a 1000 rcf) para determinar qual o melhor método de purificação, ressuspende-se novamente em 200 µL de PBS/BSA 1%.

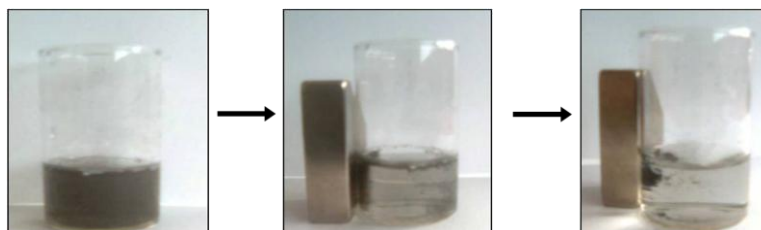


Figura VI.1- Processo de separação magnética das suspensões de nanofios de Ni.

2.3.2. Biofuncionalização dos nanofios de Ni modificados com o anticorpo

Foram adicionados 300 μL de solução EDAC (2 mg/mL, PBS pH 5.5) à suspensão de nanofios modificados (2 mg, PBS pH 5.5). A mistura foi agitada durante 5 min, e foram adicionados 100 μL de solução de anticorpo monoclonal anti-CD61 suíno (IgG, 1 mg/mL), ficando em agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Por fim, a suspensão foi lavada uma vez em tampão fosfato pH 5.5 e três vezes em tampão Tris pH 7.4, tendo sido separada magneticamente e ressuspensa em 1 mL de PBS/BSA 1%.

2.3.3. Interação específica dos nanofios com as plaquetas sanguíneas

Os nanofios biofuncionalizados foram dispersos numa solução BSA/PBS 1% e foi adicionado plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes proporções. A mistura foi incubada durante 2 h, foi separada magneticamente e lavada com solução de BSA/PBS 1%. Para os estudos de microscopia de fluorescência, foram aplicados alíquotas de 50 μL num porta-amostras.

2.4. Estudo do efeito das lavagens na estabilidade dos nanofios de Ni modificados

Os nanofios de Ni modificados com PEI-FITC (15 mL) foram lavados três vezes com água ultra-pura. Após estas lavagens, a suspensão foi dividida em três partes (5 mL) e foram efetuados três ciclos de lavagens distintos para cada um dos 5 mL: quatro lavagens com tampão fosfato pH 5.5, quatro lavagens com tampão Tris pH 7.4, e uma lavagem com tampão fosfato pH 5.5. e três lavagens com tampão Tris pH 7.4.

3. Instrumentação e métodos de análise

3.1. Potencial Zeta

As medidas de potencial zeta foram efetuadas num ZetaSizer nano ZS Model Zen 3500, da Malvern.

3.2.SEM

A microscopia eletrônica de varrimento e análise por SEM-EDX foram realizadas usando um microscópio FEG–SEM Hitachi S4100, operando a 15 kV. A preparação das amostras consistiu em colar os filmes com cola de carbono, num substrato de alumínio.

3.3.TEM

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no microscópio Hitachi H-9000 operando a 300 kVA preparação das amostras consistiu em colocar uma alíquota da amostra sobre uma grelha de cobre revestida com filme de carbono amorfo, deixando o solvente evaporar antes da análise.

3.4.FTIR-ATR

Os espectros de FTIR-ATR foram registados após 256 scans usando o espectrofotômetro FT Mattson 7000, com resolução 4 cm⁻¹.

3.5.Espectroscopia de Fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos no espectrômetro FluoroMax-3 Horiba Jobin Yvon.

3.6.Difratometria de Raios-X

A difração de raios X foi efetuada usando um difratômetro Philips X'Pert operando com radiação Cu-K α ($\lambda=1.54178$ Å) a 40 kV/50 mA.

3.7.Microscópio ótico de fluorescência

As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas no microscópio de fluorescência ZeissAxiovert 200, usando $\lambda_{exc}=537$ nm.

VII. Bibliografia

1. The British Museum Press.
http://www.britishmuseum.org/explore/highlights/highlight_objects/pe_mla/t/the_lycurgus_cup.aspx (accessed 13.10.2011).
2. Ozin, G. A.; Arsenault, A. C.; Cademartiri, L., *Nanochemistry: A chemical approach to nanomaterials*. 2nd ed.; The Royal Society of Chemistry: **2009**.
3. Zarbin, A. J. G., Química de (Nano)materiais. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1469-1479.
4. What's So Special about the Nanoscale? <http://www.nano.gov/nanotech-101/special> (accessed 10.09.2011).
5. Gould, P., Nanoparticles probe biosystems. *Materials Today* **2004**, *7*, 36- 43.
6. Ferreira, H. S.; Rangel, M. C., Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1860-1870.
7. Wu, F. Z.; Mu, C.; Liang, Y.; Xu, L.; Chen, Q.; Chen, R.; Xu, D., Electrochemical synthesis and applications of oriented and hierarchically quasi-1D semiconducting nanostructures. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1135-1150.
8. Reich, D. H.; Tanase, M.; Hulgren, A.; Bauer, L. A.; Chen, C. S.; Meyer, G. J., Biological applications of multifunctional magnetic nanowires. *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 7275-7280.
9. Chopra, N.; Gavalas, V. G.; Bachas, L. G.; Hinds, B. J.; Bachas, L. G., Functional one-dimensional nanomaterials: Applications in nanoscale biosensors. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 2067–2096.
10. Wang, J., Biomolecule-functionalized nanowires: From nanosensors to nanocarriers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *10*, 1748-1755.
11. Fert, A.; Piraux, L., Magnetic nanowires. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *200*, 338-358.
12. Chun, J.; Lee, J., Various Synthetic Methods for One-Dimensional Semiconductor Nanowires/ Nanorods and Their Applications in Photovoltaic Devices. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010*, 4251-4263.
13. Masuda, H.; Fukuda, K., Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a 2-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science* **1995**, *268*, 1466-1468.
14. O'Sullivan, J. P.; Wood, G. C., The morphology and mechanism of formation of porous anodic films on aluminium. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1970**, *317*, 511-543.
15. Xiao, Z. L.; Han, C. Y.; Welp, U.; Wang, H. H.; Vlasko-Vlasov, V. K.; Kwok, W. K.; DMiller, J.; Hiller, J. M.; Cook, R. E.; Willing, G. A.; Crabtree, G. W., Nickel antidot arrays on anodic alumina substrates. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 2869-2871.

16. Júnior, J. F. T., Anodização para obtenção de membranas cerâmicas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, **2007**.
17. Proença, M. J. P., Nanoporous alumina membranes: Fabrication Process & Template Growth of Ordered Nanotubes. Universidade do Porto, Porto, **2008**.
18. Nielsch, K.; Müller, F.; Li, A. P.; Gösel, U., Uniform Nickel deposition into ordered alumina pores by pulsed electrodeposition. *Adv. Mater.* **2000**, *128*, 582–586.
19. Sousa, C. T.; Leitão, D. C.; Proença, M. P.; Apolinário, A.; Correia, J. G.; Ventura, J.; Araújo, J. P., Tuning pore filling of anodic alumina templates by accurate control of the bottom barrier layer thickness. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 1-6.
20. Cheng, W.; Steinhart, M.; Gosele, U.; Wehrspohn, R. B., Tree-like alumina nanopores generated in a non-steady-state anodization. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 3493-3495.
21. Vazquez, M.; Pirola, K.; Hernandez-Velez, M.; Prida, V. M.; D. Navas; Sanz, R.; Batallan, F.; Velazquez, J., Magnetic properties of densely packed arrays of Ni nanowires as a function of their diameter and lattice parameter. *J. Appl. Phys.* **2004**, *95*, 6642-6644.
22. Leitao, D. C.; Sousa, C. T.; Ventura, J.; Amaral, J. S.; Carpinteiro, F.; Pirola, K. R.; Vazquez, M.; Sousa, J. B.; Araujo, J. P., Characterization of electrodeposited Ni and Ni₈₀Fe₂₀ nanowires. *J. Non-Cryst. Solids* **2008**, *354*, 5241–5243.
23. Nielsch, K.; Wehrspohn, R. B.; Barthel, J.; Kirschner, J.; Gösele, U., Hexagonally ordered 100 nm period nickel nanowire arrays. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 1359-1362.
24. Esteves, M. C., Eletrodeposição de filmes finos e materiais nanoestruturados das ligas magnéticas cobalto-níquel cobalto-níquel-molibdênio. Instituto de química de São Paulo, São Paulo, **2009**.
25. Johansson, F.; Jonsson, M.; Alm, K.; Kanje, M., Cell guidance by magnetic nanowires. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 688-694.
26. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J., Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday* **2007**, *2*, 22-32.
27. Lee, K. B.; Park, S.; Mirkin, C. A., Multicomponent magnetic nanorods for biomolecular separations. *Angew. Chem. Int.* **2004**, *43*, 3048 -3050.
28. Hultgren, A.; Tanase, M.; Chen, C. S.; Meyer, G. J.; Reich, D. H., Cell manipulation using magnetic nanowires. *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 7554-7556.
29. Adriale, P. M.; Diao, Z.; Coey, J. M. D., Internalization of ferromagnetic nanowires by different living cells. *J. Nanobiotechnology* **2006**, *4*, 1-11.

30. Gao, N.; Wang, H.; Yang, E. H., An experimental study on ferromagnetic nickel nanowires functionalized with antibodies for cell separation. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 1-8.
31. Byrne, F.; Prina-Mello, A.; Whelan, A.; Mohamed, B.; Davies, A.; Gunko, Y.; Coey, J. M. D.; Volkov, Y., High content analysis of the biocompatibility of nickel nanowires. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1341-1345.
32. Anne Hultgren, M. T., Edward J. Felton, Kiran Bhadriraju, Aliasger K. Salem, Christopher S. Chen, Daniel H. Reich, Optimization of yield in magnetic cell separations using nickel nanowires of different lengths. *Biotechnology Progress* **2005**, *21*, 509-515.
33. Bauer, L. A.; Reich, D. H.; Meyer, G. J., Selective functionalization of two-component magnetic nanowires. *Langmuir* **2003**, *19*, 7043-7048.
34. Wang, A. A.; Lee, J.; Jenikova, G.; Mulchandani, A.; Myung, N. V.; Chen, W., Controlled assembly of multi-segment nanowires by histidine-tagged peptides. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3375-3379.
35. Birenbaum, N. S.; Lai, B. T.; Chen, C. S.; Reich, D. H.; Meyer, G. J., Selective noncovalent adsorption of protein to bifunctional metallic nanowire surfaces. *Langmuir* **2003**, *19*, 9580-9582.
36. Decher, G., Fuzzy nanoassemblies:toward layered polymeric multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232-1237.
37. Schneider, G.; Decher, G., Functional core/shell nanoparticles via layer-by-layer assembly. Investigation of the experimental parameters for controlling particle aggregation and for enhancing dispersion stability. *Langmuir* **2008**, *24*, 1778-1789.
38. Magnin, D.; Callegari, V.; Mátéfi-Tempfli, S.; Mátéfi-Tempfli, M.; Glinel, K.; Jonas, A. M.; Demoustier-Champagne, S., Functionalization of magnetic nanowires by charged biopolymers. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2517-2522.
39. Zeng, X.; Sun, Y. X.; Zhang, X. Z.; Cheng, S. X.; Zhuo, R. X., A potential targeting gene vector based on biotinylated polyethyleneimine/avidin bioconjugates. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1931-1941.
40. Crea, F.; Crea, P.; Robertis, A.; Sammartano, S., Thermodynamic study for the protonation of branched poly(ethylenimine) in NaCl(aq) and its dependence on ionic strength. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 279-285.
41. Kafil, V.; Omid, Y., Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cell. *BioImpacts* **2011**, *1*, 23-30.
42. De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E., Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 113-126.

43. Hoffmann, K.; Resch-Genger, U.; Mix, R.; Friedrich, J. F., Fluorescence spectroscopic studies on plasma-chemically modified polymer surfaces with fluorophore-labeled functionalities. *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 441-448.
44. Maeda, T.; Nagahara, T.; Aida, M.; Ishibashi, T., Identification of chemical species of fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC) monolayers on platinum by doubly resonant sum-frequency generation spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2008**, *39* 1694-1702.
45. Robert, S.; Jan, N.; Mikael, K., Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*, 7-21.
46. Iain, J.; Michelle, T. Z. S., *The Molecular Probes® Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11th ed.; Life Technologies: **2010**.
47. Kakade, S.; Manickam, D. S.; Handa, H.; Mao, G.; Oupický, D., Transfection activity of layer-by-layer plasmid DNA/poly(ethylenimine) films deposited on PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* **2009**, *365*, 44-52.
48. Zhou, Z. F.; Zhou, Y. C.; Pan, Y.; Lei, W. X.; Xu, C. F., Overheating and undercooling of Ni polycrystalline nanowires. *Scr. Mater.* **2009**, *60*, 512-515.
49. Cheng, G. B.; Wei, G. C.; Hao, C. J.; Li, S. T., Synthesis of nickel hierarchical microstructures by a simple hydrothermal route. *Electron. Mater. Lett.* **2009** *5*, 123-126.
50. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. 2nd ed.; Elsevier: **2008**.
51. Voss, E. W.; Croney, J. C.; Jameson, D. M., Discrete bathochromic shifts exhibited by fluorescein ligand bound to rabbit polyclonal anti-fluorescein Fab Fragments. *J. Protein Chem.* **2002**, *21*, 231-241.
52. Lex, A.; Pacher, P.; Werzer, O.; Track, A.; Shen, Q.; Schennach, R.; Koller, G.; Hlawacek, G.; Zojer, E.; Resel, R.; Ramsey, M.; Teichert, C.; Kern, W.; Trimmel, G., Synthesis of a photosensitive thiocyanate-functionalized trialkoxysilane and its application in patterned surface modifications. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 2009-2015.
53. Donald, L. P.; Gary, M. L.; George, S. K.; James, R. V., *Introduction to spectroscopy*. 4th ed.; Brooks/Cole **2009**.
54. Stuart, B. H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*. 1st ed.; Wiley: **2004**.
55. Gregory, J.; Barany, S., Adsorption and flocculation by polymers and polymer mixtures. *Adv. Colloid. Interfac.* **2011**, *169*, 1-12.
56. Moura, W. L.; Matushima, E. R.; Oliveira, L. W.; Egami, M. I., Aspectos morfológicos e citoquímicos dos glóbulos sanguíneos de Caiman crocodilus yacare (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **1999**, *36*, 1-5.

